



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluna: Renata Alves

Orientadora: Altair Antoninha Del Bel Cury

Ano de Conclusão do Curso: 2008

TCC 459

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Renata Alves

**“Avaliação da rugosidade superficial, energia livre de superfície e adesão de
Cândida spp em resina acrílica modificada com politetrafluoretileno”**

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião- Dentista.

Orientadora: Profa. Altair Antoninha Del Bel Cury

Piracicaba

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA**

Unidade FOP/UNICAMP
 N. Chamada

 Vol. Ex.
 Tombo BC/

Unidade - FOP/UNICAMP

 Ed.
 Vol. Ex.
 Tombo
 C D
 Proc.
 Preço
 Data
 Registro 779233

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
 Bibliotecária: Marilene Girello - CRB-8ª / 6159

AL87a Alves, Renata.
 Avaliação da rugosidade superficial, energia livre de superfície e adesão de *Cândida spp* em resina acrílica modificada com politetrafluoretileno. / Renata Alves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.
 36f.

Orientador: Altair Antoninha Del Bel Cury.
 Monografia (Graduação) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Prótese dentária parcial removível. I. Del Bel Cury, Altair Antoninha. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Jorge Tadeu Alves e Márcia Castro Rodrigues Alves pela ótima educação, apoio e incentivo que me deram ao longo da vida para que eu sempre pudesse alcançar todos os meus objetivos.

Ao meu irmão Douglas Assis Alves pelo exemplo de pessoa, companheiro e amigo nas horas que mais precisei.

Ao meu namorado Daniel Giovanni Malagutti Pereira por ser meu porto seguro em todos os momentos, meu ponto de equilíbrio e meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o dom da vida e me iluminar em todos os meus passos.

A Prof^a Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury pela oportunidade, competente trabalho e grandes experiências passadas ao longo da elaboração desta monografia.

A minha co-orientadora Fabiana Gouveia Straioto pela paciência, sabedoria, dedicação e amizade.

Ao pós-graduando Antonio Pedro Ricomini Filho, a todos os professores e funcionários da área da Prótese Parcial Removível da FOP/UNICAMP pelo auxílio prestado na execução desta pesquisa.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica de Varredura e Bioquímica da FOP/UNICAMP pelo suporte técnico no desenvolvimento deste estudo.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	06
Lista de Tabelas.....	08
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	09
Abstract.....	10
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Materiais e Métodos.....	14
Resultados.....	26
Discussão.....	29
Conclusão.....	31
Referências Bibliográficas.....	32
Anexos.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resinas acrílicas termopolimerizáveis usadas no experimento: resina Clássico e resina QC – 20.....	15
Figura 2: PTFE micro-particulado adicionado à resina.....	15
Figura 3: Dispositivo para confecção do molde em silicone das matrizes metálicas.....	16
Figura 4: Mufla com molde de silicone obtido a partir das matrizes metálicas após inclusão.....	17
Figura 5: Mensuração da rugosidade superficial.....	18
Figura 6: Captura da imagem da gota séssil depositada sobre o espécime de resina acrílica.....	19
Figura 7: Imagem da gota séssil capturada por uma máquina digital para medir o ângulo de contato.....	20
Figura 8: Curva de Crescimento da <i>Candida albicans</i> (ATCC 90028).....	21
Figura 9: Espécimes imersos em saliva clarificada para formação de película adquirida.....	23
Figura 10: Após ensaio de adesão, espécime no interior do tubo criogênico submetido a sonicação para desprendimento das células aderidas.....	25

Figura 11: Placas após semeadura e crescimento dos microrganismos para contagem e cálculo das UFC/mm²25

Figura 12: Gráfico representativo (médias± DP) de UFC/mm² aderidas a superfícies (n=10).....27

Figura 13: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície em resina acrílica QC-20: (A) sem adição de PTFE (x500) e (B) com adição de 2% de PTFE (x500). A seta indica a presença de partículas de PTFE dispersas na matriz de resina acrílica, apresentando morfologia superficial diferente se comparada à microscopia anterior.....28

Figura 14: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície em resina acrílica QC-20: (A) sem adição de PTFE (x500) e (B) com adição de 2% de PTFE (x500). A seta aponta a presença de células de microrganismo aderidas à superfície do material.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias e desvios-padrão de rugosidade, ângulo de contato e energia livre de superfície (n=10).....	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius

ELS: energia livre de superfície

Erg/cm²: unidade de energia, centímetro-grama-segundo por centímetro quadrado

et al: abreviatura de “et alii”

mm: milímetro

MEV: microscopia eletrônica de varre

N: Newton

nm: nanômetro

PBS: solução tampão fosfato

PMMA: polimetilmetacrilato

PTFE: politetrafluoretileno

Ra: rugosidade de superfície

UFC: unidade formadora de colônia

µm: micrômetro

µL: microlitro

λ: comprimento de onda

ABSTRACT

The colonization of removable dental prostheses with microorganisms improves the development of denture stomatitis, which is associated with adherence and colonization of *Candida albicans*. Acrylic resin properties such as roughness and surface free energy can contribute to the colonization and biofilm development formed by these microorganisms. Thus, the addition of modifiers that can interfere with the specific interactions between microorganisms and polymer surface has been proposed. One of the main modifier suggested is polytetrafluorethylene because its properties. Therefore, the aim of this study was to evaluate the surface roughness, contact angle, free surface energy and initial adherence between *Candida albicans* on acrylic resin modified with PTFE. Specimen (20 x 12 x 2 mm) of acrylic resin (long and short cycle), without (control group) and with addition of 2% of PTFE were prepared and had the surface (roughness, surface free energy) characteristics evaluated. Moreover, *Candida albicans* adherence (UFC) was evaluated. The data were submitted to ANOVA and Tukey test with significance level of 5%. No statistical significance differences were found for roughness, surface free energy and number of colony forming units between the resins. Contact angle values were high for resin containing 2% PTFE polymerized by long cycle. In conclusion the addition of 2 % of PTFE was not enough for producing surface modification and reduction of *Candida albicans*.

RESUMO

A colonização de próteses removíveis por microrganismos favorece o desenvolvimento de estomatite protética que está associado principalmente à adesão e colonização por *Candida albicans*. Propriedades da resina acrílica como a rugosidade e energia livre de superfície podem contribuir para a colonização e maturação de biofilmes formados por esses microrganismos. Portanto, a adição de modificadores que possam alterar as características de superfície, atuando nas interações específicas entre microrganismos e superfície dos polímeros têm sido propostas. Dentre estes modificadores destaca-se o politetrafluoretileno (PTFE). Assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar a rugosidade, ângulo de contato e energia livre de superfície, além da adesão inicial de *Candida albicans* de duas resinas acrílicas modificadas com PTFE. Espécimes (20x12x2mm) de resinas termopolimerizáveis (ciclo longo e curto) com a adição de 2% de PTFE e sem (Controle) foram confeccionados e as características de superfície (rugosidade, energia livre, ângulo de contato) e adesão inicial de *Candida albicans* (UFC), foram determinadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey com nível de significância de 5%. Não foram observadas diferenças significantes entre as resinas para rugosidade e energia livre de superfície e número de unidades formadoras de colônia. A resina termopolimerizável de ciclo longo adicionada de 2% de PTFE apresentou maior valor de ângulo de contato ($p < 0,05$). Concluí-se que a adição de 2% de PTFE não foi suficiente para produzir alterações na superfície das resinas estudadas e interferir com a adesão inicial de *Candida albicans*.

INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta superfícies susceptíveis à colonização de microrganismos, especialmente portadores de próteses removíveis, nas quais são formados biofilmes de diferentes complexidades variando a cada indivíduo (Aas *et al.*, 2005; Schadeo *et al.*, 2008) e expondo os usuários ao risco de infecções locais (Budtz-Jørgensen, 1978) e ocasionalmente sistêmicas (Edmond *et al.*, 1999; Bouza *et al.*, 2002; Schadeo *et al.*, 2008).

Aproximadamente ¾ dos casos de infecções hospitalares (64,4%) são causados por organismos gram-positivos e espécies de *Candida*, os quais são o quarto tipo de microrganismos mais prevalentes encontrados (Henriques *et al.*, 2004). Em relação à mortalidade foi encontrado que 20,8% dos casos estavam relacionados com estafilococos coagulase-negativo e 39,9% com espécies de cândida (Edmond *et al.*, 1999).

Espécies de cândida são os fungos mais prevalentes na cavidade oral e o principal associado à estomatite protética (Budtz-Jørgensen, 1978), apresentando a habilidade de crescer em situações ambientais adversas (Thein *et al.*, 2007) e conhecida resistência a antifúngicos (Kontoyiannis *et al.*, 2002; Sanglard *et al.*, 2002).

Infecções fúngicas são comuns em indivíduos com síndrome da imunodeficiência (Tellier *et al.*, 1992; Samaranayake *et al.*, 2002). Candidose oral, especificamente, é um problema rotineiro em pacientes com o referido quadro clínico, resultado da disfunção do sistema de imune. Conseqüentemente, o aumento do uso de drogas antifúngicas para profilaxia e tratamento destas

infecções, colaboram no aparecimento de cepas resistentes a medicamentos (Samaranayake *et al.*, 2002).

Numerosos microrganismos são comumente encontrados na superfície de próteses removíveis, devido presença de irregularidades e poros, suportando os achados que esta representa um reservatório de microrganismos responsáveis por infecções (Davenport, 1970; Jagger *et al.*, 2002).

A adesão de microrganismos a um substrato é governada por interações físico-químicas como a hidrofobicidade (Colling *et al.*, 2005), energia livre de superfície e diferenças na topografia de superfície (Verran *et al.*, 1997). Quirynen *et al.* (1995), destacaram a relevância dessas características de superfície no desenvolvimento de biofilme, especialmente com estágios iniciais de adesão.

O mecanismo de adesão de microrganismos a superfície de polímeros é processo conhecido, e a introdução de moléculas específicas (agentes bloqueadores) na superfície destes materiais poliméricos com o objetivo de inibir essas interações específicas se fazem interessante (Jansen, 1990).

Fluorpolímeros, de maneira geral, são polímeros ou copolímeros de hidrocarbonetos saturados os quais todos ou alguns átomos de hidrogênio foram substituídos por átomos de flúor ou combinação de flúor e cloro (Drobny, 2001). A principal característica deste material é ser uma substância praticamente inerte, não reage com outras substâncias químicas exceto em situações muito especiais. Isto se deve basicamente a proteção dos átomos de flúor sobre a cadeia carbônica. Esta carência de reatividade permite que sua toxicidade seja praticamente nulo sendo, também, o material com o mais baixo coeficiente de atrito conhecido. Outra qualidade é sua impermeabilidade, mantendo, portanto, suas propriedades em

ambientes úmidos. Por estas características especiais, além da baixa aderência e aceitabilidade ótima pelo corpo humano é usado como material de eleição pra confecção de diversos tipos de próteses médicas (Drobny, 2001).

Esforços objetivando a redução do crescimento de biofilme em superfície de materiais médicos e odontológicos devem estar focados na prevenção da adesão inicial ou inibindo o crescimento dos microrganismos aderidos (Francolini *et al.*, 1995).

A hipótese a ser testada é que a adição de politetrafluoretileno (PTFE) à composição das resinas a base de polimetilmetacrilato, possa melhorar as características de superfície, evitando-se ou diminuindo a aderência de microrganismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental:

Este estudo foi *in vitro*, cego e totalmente aleatorizado. Os espécimes das resinas acrílicas foram confeccionados e divididos em quatro grupos experimentais: resina acrílica polimerizada em banho de água durante 9h (Clássico Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) e resina acrílica de rápida polimerização em banho de água fervente em 20 minutos (QC - 20 ,Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil), sem e com adição de 2% de PTFE, ambas cor rosa (Figura 1). O estabelecimento da porcentagem de PTFE (Figura 2) adicionado foi avaliado em um estudo inicial, com diferentes concentrações e analisando a alteração da

dureza de superfície. Dessa maneira foi determinada a proporção de 2% de PTFE a de eleição para desenvolvimento do estudo.



Figura 1: Resinas acrílicas termopolimerizáveis usadas no experimento: resina Clássico e resina QC – 20



Figura 2: PTFE micro-particulado adicionado à resina

Preparo dos espécimes:

Para a realização deste estudo foram confeccionados padrões em aço inox nas dimensões de 20 x 12 x 2 mm, incluídos em 5mm de silicone laboratorial (Zeta Labor, Zermack, S.P.A, Itália) para obtenção do molde padrão (Figura 3). O molde foi posicionado no interior da base da mufla metálica e preenchido com gesso pedra tipo III Herodent (Vigodent, S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, a contra-mufla foi posicionada e preenchida com gesso, após a cristalização foi aplicada uma camada de silicone laboratorial. Fechou-se então a mufla e levou-se à prensa hidráulica por um período de 10 minutos para completa polimerização do material (Figura 4).

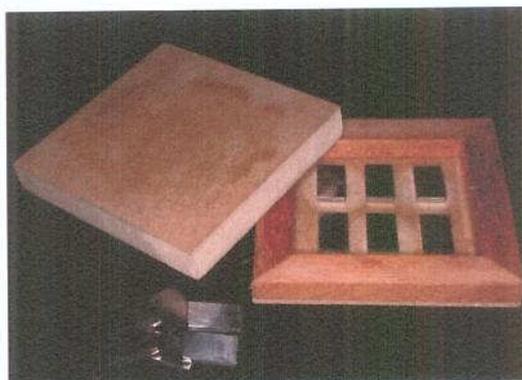


Figura 3: Dispositivo para confecção do molde em silicone das matrizes metálicas

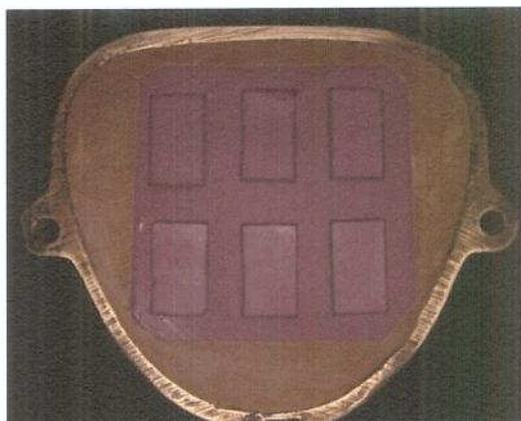


Figura 4: Mufla com molde de silicone obtido a partir das matrizes metálicas após inclusão

Para o preparo da resina, inicialmente adicionou-se o PTFE pré pesado ao pó da resina acrílica, mexendo com auxílio de uma espátula, vagarosamente, para a obtenção de mistura mais homogênea possível e a seguir adicionou-se o monômero. Na fase plástica, a resina foi entulhada na mufla e esta foi fechada e posicionada em prensa hidráulica.

Posteriormente, as muflas foram levadas a prensa de mola e o conjunto (mufla+prensa) dos grupos da resina Clássico foram levados a polimerizadora automática (P100 – Termotron, Piracicaba, SP), durante 9 horas a 70°C (ciclo longo de polimerização). As muflas contendo a resina de ciclo curto foram imersas em água a temperatura ambiente até a temperatura de ebulição e aí mantidas durante 20 minutos.

Após a polimerização, os espécimes foram acabados, colados com cera pegajosa em discos de acrílico e polidos com lixas de granulação de 320, 400, 600 (Carbimet; Buehler, Lake Bluff, USA) em politriz mecânica (Arotec APL-4; São Paulo, Brasil). O polimento dos espécimes foi realizado com escova de pêlo preta e

pedra-pomes e branco de espanha com escova de feltro (Braun *et al.*, 2003, Moura *et al.*, 2006). Posteriormente, todos os espécimes foram limpos em banho de água ultrassônico (T7; Thornton, Vinhedo, São Paulo, Brasil) por 2 minutos e armazenados imersos em água deionizada em frascos previamente identificados durante 48h para liberação do monômero residual.

Avaliação da rugosidade de superfície:

A rugosidade de superfície (Ra) foi avaliada por meio de um rugosímetro (Surfcorder SE 1700 Kozaka Industry, Kozaja, Japan) com o diâmetro da ponta ativa de 2 μ m, precisão de 0,01 μ m de resolução e velocidade de 0,5mm/s sob pressão constante de 0,07N (Figura 5). As leituras foram realizadas em 0,8mm ao longo de 2,4mm da amostra, em temperatura ambiente. Foram realizadas também mensurações em três diferentes locais de cada amostra, obtendo-se média aritmética, a qual especificou o valor médio de rugosidade de superfície para aquele espécime (Verran & Maryan, 1997, Moura *et al.*,2006; Pereira-Cenci *et al.*, 2007).

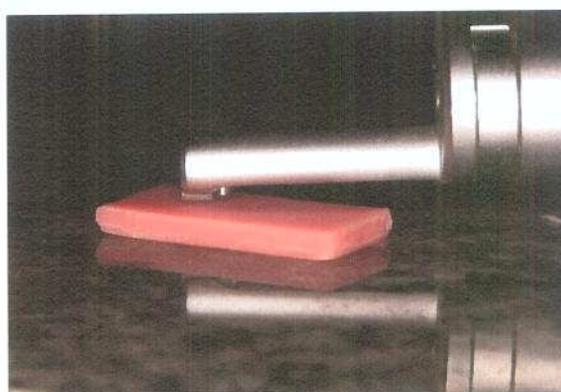


Figura 5: Mensuração da rugosidade superficial

Avaliação do ângulo de contato e cálculo da energia livre de superfície:

A energia livre de superfície (erg/cm^2) foi mensurada com a deposição de $15\mu\text{L}$ de água destilada deionizada com auxílio de uma micropipeta em espécime (Moura *et al.*, 2006). A imagem da gota séssil foi capturada por uma máquina digital Nikon, sob condições padrão e o ângulo de contato foi mensurado pela leitura da imagem capturada no programa Auto Cad R14 (Auto Desk, Sankt Augustin, Estados Unidos), dos limites esquerdo das fotografias ao ponto de intercessão amostra-água-ar (Figura 6). Para cada espécime, a mensuração foi realizada três vezes, pela deposição do líquido depositado em locais diferentes, sendo usado, portanto, valor médio das três mensurações para cada superfície. A partir do ângulo de contato obtido, o cosseno do respectivo ângulo foi utilizado para a obtenção do valor de energia livre de superfície (Moura *et al.*, 2006, Pereira-Cenci *et al.*, 2007) (Figura 7).

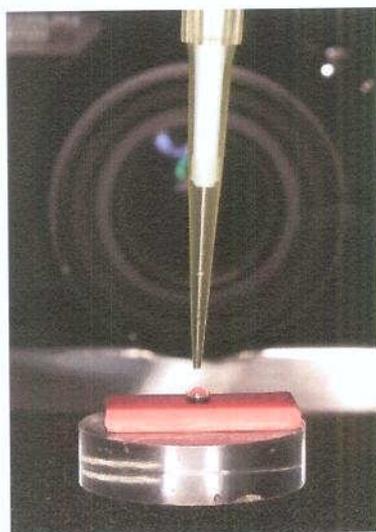


Figura 6: Captura da imagem da gota séssil depositada sobre o espécime de resina acrílica



Figura 7: Imagem da gota séssil capturada por uma máquina digital para mesurar o ângulo de contato

Ensaio de adesão inicial de *Candida albicans*:

Os espécimes foram divididos aleatoriamente para comporem os 04 grupos. Cada grupo foi submetido ao ensaio de adesão em diferentes dias, com o objetivo de verificar a reprodutibilidade dos resultados. Posteriormente, foi realizada a remoção dos contaminantes por meio de banho em ultrassom em água destilada e deionizada estéril por 20min em ultra som (Luo *et al.*, 2002).

Inóculo e condições de crescimento:

Com o objetivo de determinar o padrão de crescimento do microrganismo selecionado para o desenvolvimento do ensaio microbiológico foi realizada uma curva de crescimento do microrganismo.

Primeiramente foi realizada a reativação da cultura de *Candida albicans* (ATCC 90028), a qual estava armazenada à -70°C . O volume total de cultura descongelada foi repartido em dois tubos plásticos, cada um contendo 10 mL de caldo Sabouraud. Os tubos foram incubados em aerobiose à 37°C durante 24 horas.

Decorrido este período com o auxílio de uma alça plástica descartável uma alíquota foi coletada e esgotada sobre a superfície de ágar Sabouraud. Após incubação em aerobiose à 37° C durante 24 horas as colônias formadas sobre o ágar foram utilizadas para realizar a curva de crescimento.

Em tubos de vidro contendo em cada 10 mL de caldo Sabouraud foram inoculadas 2 colônias isoladas em cada tubo. Esses tubos foram incubados em aerobiose à 37° C e em intervalos de 1 hora foram realizadas leituras em espectrofotômetro ($\lambda=530$ nm) a partir da primeira hora de crescimento. A quantidade de tubos foi suficiente para que as leituras fossem realizadas em triplicata, totalizando 15 horas de leituras consecutivas.

Tendo em vista o padrão do crescimento da *C. albicans* foi possível determinar que a partir de 11 horas o perfil de crescimento do microrganismo tende a fase estacionária (Figura 8), dessa maneira foi estabelecido fazer os ensaios de adesão nas 2 horas prévias (intervalo de crescimento entre 9 e 11 horas).

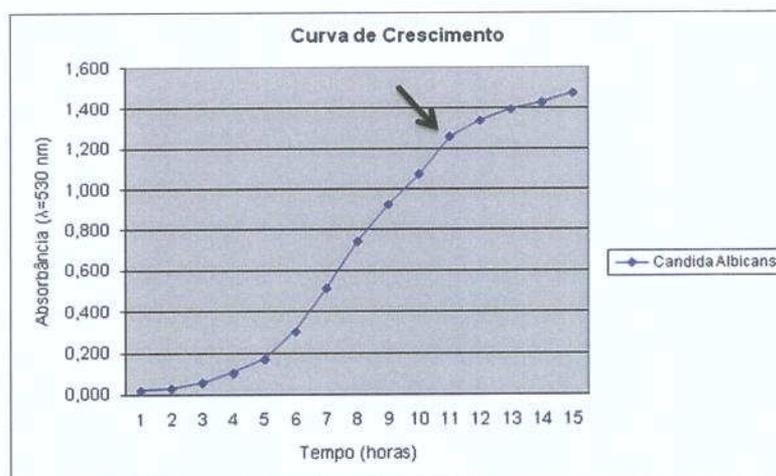


Figura 8: Curva de Crescimento da *C. albicans* (ATCC 90028)

Conhecido o comportamento do microrganismo, e que após 9 horas de crescimento este encontrava-se na fase exponencial, com multiplicação ativa, mas não se tinha o conhecimento de quantas unidades formadoras de colônias (UFC/mL) havia após o período de 9 horas, tempo estipulado para o início dos ensaios de adesão.

Para descobrir a concentração de microrganismo após 9 horas de crescimento foi realizada novamente a inoculação de 2 colônias em tubo plástico contendo agar Sabouraud (foram feitos 2 tubos) e incubado em aerobiose à 37° C durante 9 horas.

Após esse período, foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em microtubos. Em um microtubo contendo 900 μ L de solução tampão fosfato (PBS/pH 7,4) foi pipetado 100 μ L de inóculo proveniente do tubo de crescimento original diluindo na proporção de 1:10. Uma alíquota de 100 μ L da primeira diluição foi novamente diluída em 900 μ L de solução PBS, originando uma diluição de 1:100 e assim sucessivamente até a diluição de 1:100.000.000 (10^{-8}). Após esse procedimento, 25 μ L de cada diluição foi semeada em triplicata sobre a superfície de agar Sabouraud as placas de petri incubadas em aerobiose à 37° C durante 24 horas.

Foram contadas as UFC/mL na diluição contendo de 6 a 60 UFC. Os resultados foram calculados e pode-se observar que após um período de 9 horas de crescimento o número médio de UFC/mL era de $7,9 \times 10^6$. Esse valor estava dentro da concentração de colônias preconizadas para o início do ensaio de adesão, o qual deve ser ao redor de 10^6 UFC/mL.

Coleta de saliva e preparo do ensaio de adesão:

Foram coletados 50 mL de saliva estimulada de um único voluntário saudável, que não relatou o uso de antibiótico e outros medicamentos que alterem o fluxo salivar nos últimos 3 meses e que manifestou sua concordância por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo comitê de ética local. A saliva coletada foi centrifugada em 10.000 g por 10 minutos a 4 °C (Milsap *et al.*, 1999). O sobrenadante foi coletado e os espécimes imersos na saliva e incubados a 37 °C durante 30 minutos para a formação da película adquirida, simulando as condições encontradas *in vivo* (Figura 9). Decorrido este tempo, os espécimes foram removidos com pinça estéril e o excesso de saliva removido para serem imediatamente submetidos à exposição dos microrganismos (Moura *et al.*, 2006).



Figura 9: Espécimes imersos em saliva clarificada para formação de película adquirida

Ensaio de adesão:

Os espécimes foram posicionados em placas de petri estéreis. Sobre os espécimes foi vertida 20mL de suspensão de *C. albicans* em caldo Sabouraud com concentração inicial de 10^6 UFC/mL e incubados em aerobiose a 37 °C durante 2 horas para permitir a adesão inicial dos microrganismos (Nikawa *et al.*, 2002).

No mesmo momento, foi realizada a diluição seriada desta suspensão de *C. albicans* usada no ensaio assegurando desta forma que o ensaio foi realizado dentro dos padrões proposto de 10^6 UFC/mL. Decorrido 2 horas de incubação cada espécime foi lavado em PBS (Nikawa *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2006) e inserido em tubo criogênico, contendo 5,5 mL de PBS.

Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL):

Os tubos contendo os espécimes foram armazenados em gelo e o volume do interior do tubo juntamente com o espécime foi submetido a vibração ultrassônica (Verran *et al.*, 1996) durante 30 segundos a uma potência de 7 watts, possibilitando o desprendimento das células aderida (Figura 10). Após, foi realizada diluição decimal seriada e semeadura em placa de ágar Sabouraud. Foram realizadas as contagens nas diluições e calculado a concentração de UFC/mL contida na solução original na qual o espécime foi sonificado e o total de UFC sobre a área da superfície dos espécimes (Figura 11).



Figura 10: Após ensaio de adesão, espécime no interior do tubo criogênico submetido a sonicação para desprendimento das células aderidas



Figura 11: Placas após semeadura e crescimento dos microrganismos para contagem e cálculo das UFC/mm²

Microscopia eletrônica de Varredura (MEV):

Para a análise em MEV, espécimes extras de cada grupo foram usados. Após o ensaio os espécimes contaminados foram imersos em glutaraldeído a 2% para fixação das células aderidas por 2 horas, lavados com água destilada

deionizada e secos. Posteriormente foram acoplados a stubs, e submetidos ao recobrimento da superfície com ouro para posterior análise da morfologia da topografia de superfície (JSM - 5600LV) (Joel, Peabody, Massachusetts, USA).

Análise Estatística:

Os dados foram submetidos à análise estatística usando software SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc. Carolina do Norte, Estados Unidos). O nível de significância estabelecido foi 5%. Os grupos de dados que não atenderam as pressuposições de normalidade e simetria de distribuição foram transformados: inverso para Ra e raiz quadrada para UFC. Posteriormente, submetidos a análise de variância e teste de Tukey.

RESULTADOS

As variáveis rugosidade e energia livre de superfície não apresentaram diferença estatística quando comparado os grupos com e sem PTFE (Tabela 1, $p > 0,05$). Foi detectada diferença estatística para ângulo de contato; a adição de PTFE a resina polimerizada pelo ciclo longo resultou em aumento do ângulo (Tabela 1, $p < 0,05$).

Tabela 1: Médias e desvios-padrão de rugosidade, ângulo de contato e energia livre de superfície (n=10):

	Rugosidade de superfície (µm)	Ângulo de contato (°)	Energia livre de superfície (erg/cm ²)
Clássico Controle	0,43 ± 0,13a	62,85 ± 2,31 ^a	43,69 ± 1,52a
Clássico 2% PTFE	0,46 ± 0,23a	66,39 ± 2,46b	44,50 ± 1,70a
QC-20 Controle	0,41 ± 0,18a	64,61 ± 2,68 ^a	44,28 ± 2,67a
QC-20 PTFE	0,48 ± 0,23a	63,69 ± 3,72 ^a	43,28 ± 1,53a

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre presença/ausência de PTFE na mesma variável analisada (p<0,05).

Nas condições experimentais não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as contagens de UFC/mm² dos grupos sem e com adição de PTFE (Figura 12, p>0,05).

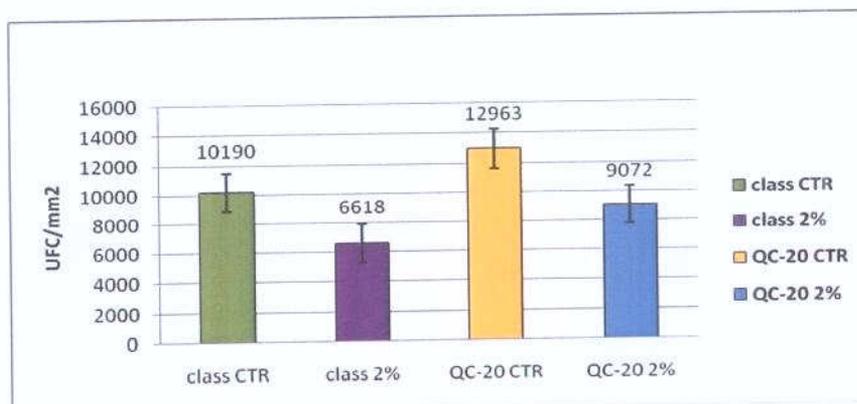
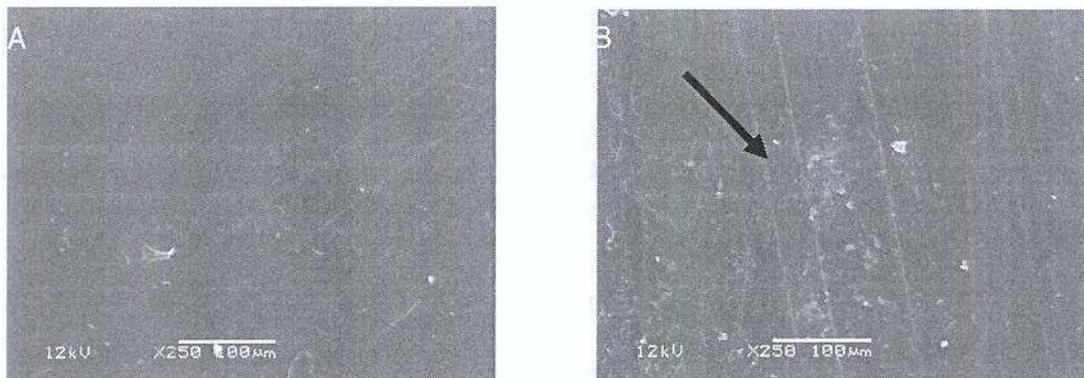


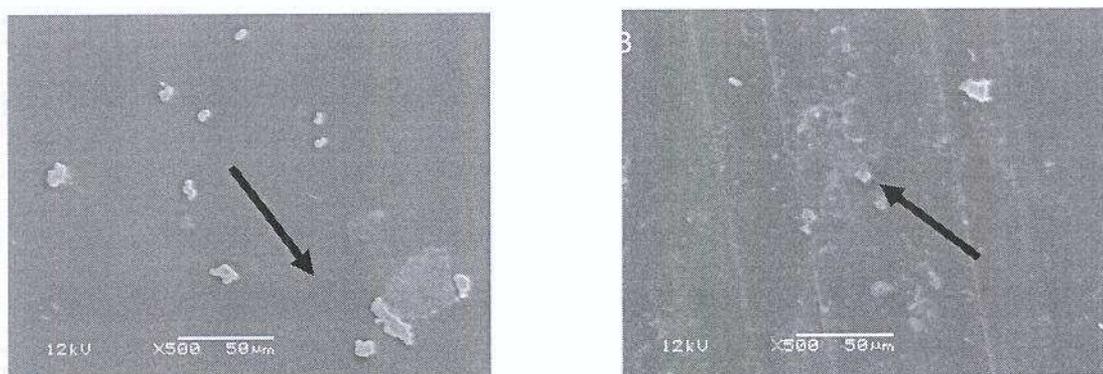
Figura 12: Gráfico representativo (médias ± DP) de UFC/mm² aderidas a superfícies (n=10)

As imagens de MEV, em ambos os grupos analisados foi possível verificar a presença de ranhuras e defeitos na superfície da resina acrílica, supostamente causada durante o processo de acabamento e polimento dos espécimes (Figura 3). Regiões com presença de células de microrganismos foram encontradas em

ambos os grupos analisados validando os resultados encontrados após sonicação de contagem de UFC/mm² (Figura 14).



Figuras 13: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície em resina acrílica polimerizada pelo ciclo longo: (A) sem adição de PTFE (x500) e (B) com adição de 2% de PTFE (x500). A seta indica a presença de partículas de PTFE dispersas na matriz de resina acrílica, apresentando morfologia superficial diferente se comparada à microscopia anterior.



Figuras 14: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície em resina acrílica polimerizada pelo ciclo : (A) sem adição de PTFE (x500) e (B) com adição de 2% de PTFE (x500). A seta aponta a presença de células de microrganismo aderidas à superfície do material.

DISCUSSÃO

No presente estudo os resultados mostram que, embora exista a tendência de diminuição do número de UFC/mm² nos grupos com adição de 2% de PTFE, esta não foi o suficiente para influenciar na adesão inicial de *C.albicans*.

Há diferentes métodos que possibilitam a contagem de células aderidas à superfície de materiais, dificultando a comparação dos resultados obtidos devido limitações inerentes em cada um. O método selecionado neste estudo para avaliação do número de células aderidas foi o da contagem dos microrganismos das superfícies pelo método de vibração ultrassônica, proporcionando completa remoção das células aderidas (Verran *et al.*, 1997), o que não é possível por meio de processo de lavagem simples, a qual não é capaz de eliminar as forças de adesão.

Os resultados encontrados referentes à adesão inicial estão em concordância com estudo *in vitro* que compara a habilidade de diferentes espécies de *Candida ssp* em aderir em resina acrílica e hidroxiapatita, utilizando para quantificação técnica computadorizada de análise de imagem (Henrique *et al.*, 2004). Porém, quando comparado a estudos que usaram método de contagem em microscópio de luz (Samaranayake *et al.*, 1980; Moura *et al.*, 2006), os resultados foram maiores, o que pode ser atribuído a limitação da contagem manual de somente alguns campos da área total, sugerindo que o método de contagem pode influenciar no valor numérico final.

As propriedades do substrato, como carga da superfície, energia livre de superfície, hidrofobicidade e rugosidade estão relacionadas com o processo de adesão inicial de microrganismos (Quirynen *et al.*, 1995; Verran *et al.*, 1997; Colling

et al., 2005). A adesão de microrganismos na superfície de biomateriais depende da estrutura e composição da superfície associada às propriedades físico-químicas da superfície celular do microrganismo (Busscher *et al.*, 1984). Desta forma, como o verificado na Tabela 1, a adição de 2% de PTFE não foi o suficiente para causar modificações significativas tanto na rugosidade quanto na energia livre de superfície justificando dessa forma a ausência de diferença de adesão de microrganismo.

Neste estudo a realização do ensaio de adesão após a formação de película adquirida com a saliva natural, insere ao estudo a presença de proteínas como mucina e a adsorção de outras glicoproteínas salivares, influenciando a adesão pela presença de interações específicas (Sipahi *et al.*, 2001; Dodds, 2005). Estudos mostraram que a saliva é capaz de diminuir a rugosidade e a energia livre de superfície de resinas acrílicas (Sipahi *et al.*, 2001; Radford *et al.*, 1998), modificando conseqüentemente o comportamento desses materiais frente a adesão de microrganismos (Pereira-Cenci *et al.*, 2007), sugerindo dessa forma, um possível mascaramento do efeito da adição do PTFE a resina acrílica.

Entretanto, foi encontrado aumento do valor de ângulo de contato para o grupo da resina polimerizada pelo ciclo longo com adição de 2% de PTFE, sugerindo a hipótese que talvez maiores concentrações de PTFE possam influenciar nas características de superfície. Porém, para isso, como a associação de PMMA e PTFE se caracteriza por ser uma blenda polimérica completamente imiscível, apresentando morfologia grosseira entre as fases. Assim, será necessária a investigação e uso de um agente compatibilizante (Koning *et al.*, 1998).

Com base na importância de quadros clínicos de candidose, especialmente as recorrentes, que possuem a peculiaridade da dificuldade de tratamento (Samaranayake *et al.*, 2002), focar no desenvolvimento de materiais que diminuam a colonização de microrganismos, agindo como um fator coadjuvante na diminuição do risco destas infecções se faz interessante no momento (Francolini *et al.*, 1995, Jansen, 1990).

A adesão de *Candida* na mucosa oral é o pré-requisito para o estabelecimento da infecção, culminando no quadro de candidíase oral (Samaranayake *et al.*, 2002). Considerando as limitações intrínsecas ao estudo, apenas a adesão inicial foi testada, entretanto mais pesquisas devem ser realizadas objetivando a avaliação desse material quando submetido a formação de biofilme.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados acima descritos é possível concluir que a concentração de 2% de PTFE não foi suficiente para produzir alterações superficiais e redução na adesão inicial de *Candida albicans*. Sugere o desenvolvimento de outros estudos focados no aumento da porcentagem de PTFE na resina acrílica, desde que um agente compatibilizante seja usado com o objetivo de melhorar a interface entre os polímeros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-32.
2. Bouza E, Burillo A, Muñoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clinical Microbiology and Infection.* 2002; 8(5): 265-274.
3. Braun KO, Mello JA, Rached RN, Del Bel Cury AA. Surface texture and some properties of acrylic resins submitted to chemical polishing. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(1):91-8.
4. Budtz-Jørgensen E. Clinical aspects of Candida infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc.* 1978; 96(3): 474-9.
5. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1984; 48(5): 980-3.
6. Colling L, Essmann M, Hollmer C, Larsen B. Surface modifying substances that reduce apparent yeast cell hydrophobicity. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005; 13(3):171-7.
7. Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J.* 1970; 129(4): 151-6.
8. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent.* 2005; 33(3):223-33.
9. Drobny JG. Blends and composites based on fluropolymers. *Macromol.Symp.* 2001; 170(1): 149-156.

10. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999 Aug;29(2):239-44.
11. Francolini I, Donelli G, Stoodley P. Polymer Designs to Control Biofilm Growth on Medical Devices. Reviews. *Environmental Science and Biotechnology*. 2005; 2(2-4): 307-319.
12. Jagger DC, Al-Akham L, Harrison A, Rees JS. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. *Int J Prosthodont*. 2002; 15(6):549-52.
13. Jansen B. Bacterial adhesion to medical polymers--use of radiation techniques for the prevention of materials-associated infections. *Clin Mater*. 1990; 6(1): 65-74.
14. Koning C, Van Duin M, Pagnoulle C, Jerome R. Strategies for compatibilization of polymer blends. *Progress in Polymer Science*. 1998; 23(4): 707-757.
15. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Review. *Lancet*. 2002; 359(9312): 1135-44.
16. Henriques M, Azeredo J; Oliveira R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2004; 33(15): 235-241.
17. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(8): 2971-4.

18. Millsap KW, Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999; 75(4): 351-9.
19. Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues Garcia RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 2006; 96(3): 205-11.
20. Nikawa H, Jin C, Makihira S, Hamada T, Samaranayake LP. Susceptibility of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-positive patients to histatin-5. *J Prosthet Dent*. 2002; 88(3): 263-7.
21. Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007; 20(3): 308-10.
22. 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 Jan;22(1):1-14. Review.
23. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent*. 1998; 26(7): 577-83.
24. Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM, Blignaut E, Wanzala P. Fungal infections associated with HIV infection. Review. *Oral Dis*. 2002; 8(Suppl 2): 151-60.

25. Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Review. *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5(4): 379-85.
26. Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the Edentulous Oral Cavity. *J Prosthodont.* 2008 Jul;17(5):348-56.
27. Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent.* 2001; 29(3): 197-204.
28. Tellier R, Krajden M, Grigoriev GA, Campbell I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(8): 1619-25.
29. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(8): 761-7.
30. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997; 77(5): 535-9.



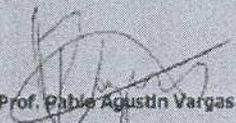
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

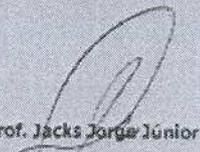


CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação in vitro do comportamento mecânico e adesão de microorganismos em resina acrílica modificada com politetrafluoretileno", protocolo nº 112/2006, dos pesquisadores **ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, FABIANA GOUVEIA STRAIOTO e RENATA ALVES**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 01/07/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba – State University of Campinas, certify that the project "In vitro analysis of the mechanical behavior and adherence of microorganisms on polytetrafluoroethylene modified acrylic resin", register number 112/2006, of **ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY, FABIANA GOUVEIA STRAIOTO and RENATA ALVES**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 01/07/2008.


Prof. Pablo Agustín Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.