UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDAE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNICAMP

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Formação e desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp. sobre a superfície de resina a base de poli(metilmetacrilato) na presença de saliva e diferença de posicionamento: efeitos sobre a morfologia e quantificação do biofilme

Aluno(a): Camila Cordeiro Pousa

Orientador(a): Wander José da Silva

Ano de Conclusão do Curso: 2011

Assinatura do(a) Orientador(a)

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Formação e desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp. sobre a superfície de resina a base de poli (metilmetacrilato) na presença de saliva e diferença de posicionamento: efeitos sobre a morfologia e quantificação do biofilme

Autor: Camila Cordeiro Pousa

Piracicaba

2011

CAMILA CORDEIRO POUSA

Formação e desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp. sobre a superfície de resina a base de poli (metilmetacrilato) na presença de saliva e diferença de posicionamento: efeitos sobre a morfologia e quantificação do biofilme

Orientador: Prof. Dr. Wander José da Silva

Piracicaba
2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P867f

Pousa, Camila Cordeiro, 1989-
Formação e desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp. sobre a superfície de resina a base de poli (metilmetacrilato) na presença de saliva e diferença de posicionamento: efeitos sobre a morfologia e quantificação do biofilme / Camila Cordeiro Pousa. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Wander José da Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Candida albicans*. 2. Microscopia confocal. I. Silva, Wander José da, 1980- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

RESUMO

Neste estudo *in vitro,* foi avaliada a influência da película adquirida (PA) e do posicionamento do substrato de resina acrílica sobre a atividade metabólica e contagem celular de biofilme de *Candida albicans.* Espécimes de resina de poli (metilmetacrilato) foram utilizados como substrato e aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais: PSH - presença de PA e substrato posicionado horizontalmente PSV- presença de PA e substrato posicionado verticalmente; APSH- ausência de PA e substrato posicionado horizontalmente e APSH- ausência de PA e substrato posicionado verticalmente. Biofilmes de *C. albicans* foram avaliados quanto a bioatividade, pela técnica de redução de XTT, e contagem celular, por diluição decimal seriada, após a fase de adesão, 24, 48 e 72 h. Os dados foram submetidos a Análise de Variância e teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a presença da película adquirida e o posicionamento vertical do substrato propiciaram formação de biofilmes com menor metabolismo e menor número de células em todos os períodos avaliados e diferiram significantemente das demais condições ($p<0.0001$). Concluiu-se que o posicionamento do substrato e a presença da película adquirida interferiram com a formação de biofilmes.

Palavras chave: *Candida albicans,* Biofilme, RAAT

ABSTRACT

The aim of this was to evaluate, in vitro, the influence of acquired pellicle (AP) and the position of the substrate in the biofilm model of *Candida albicans*. For this, specimens in poly (methyl methacrylate) were used as substrate and randomly divided into 4 experimental groups: G1) presence of AP and substrate positioned horizontally; G2) presence of AP and substrate positioned vertically; G3) absence of AP and substrate positioned horizontally and G4) absence of AP and substrate positioned vertically. The biofilms of *C. albicans* had their bioactivity and cell count measured after the adhesion phase, 24, 48 and 72 hour development. The data were analysed by ANOVA followed by Tukey test with significance to 5%. The condition with the presence of acquired film ($p<0.0001$) and the substrate positioned on vertical ($p< 0.0001$) showed biofilms lower bioactive and cell counting. Within the limitations of this study, it was possible to conclude that the vertical positioning of the substrate and the presence of AP promotes different development of biofilms of *C. albicans* when compared to biofilm developed horizontally.

Key Words: *Candida albicans,* Biofilm, RAAT

SUMÁRIO

- Introdução.....pág. 6

- Proposição.....pág. 7

- Materiais e métodos.....pág. 7

- Preparo dos espécimes em resina.....pág. 7

- Análise da superfície dos corpos de prova.....pág. 7

- Tratamento de superfície.....pág. 8

- Grupo de estudo.....pág. 9

- Análise microbiológica.....pág. 9

- Reativação dos espécimes.....pág. 9

- Formação do biofilme.....pág. 10

- Análise quantitativa .....pág. 10

- Análise morfológica.....pág. 10

- Resultados.....pág. 12

- Discussão.....pág. 15

- Conclusão.....pág. 16

- Referência bibliográfica.....pág. 16

1. INTRODUÇÃO

Na candidose, ou estomatite induzida por prótese cuja prevalência é de 11 a 67% dos usuários de próteses dentárias removíveis, a *C. albicans* atua como o patógeno mais importante e mais virulento [1-3]. Esta associação como principal patógeno está diretamente relacionada à sua eficiência de colonizar e aderir substratos como a superfícies de próteses dentárias removíveis.

O substrato apresenta características que podem interferir na maior ou menor adesão destes microorganismos. Na matriz polimérica das resinas de poli (metilmetacrilato), as cadeias internas apresentam-se em equilíbrio dinâmico, uma vez que as cadeias circundantes exercem uma atração de mesma intensidade em sentido contrário, o que não ocorre nas cadeias externas onde esse equilíbrio é inexistente. Essa diferença de atração molecular nas cadeias externas resulta na energia livre de superfície, que se relaciona com a energia eletrostática da parede celular do microrganismo, promovendo a atração da mesma [1,4-6] caracterizando o *processo de adesão inicial.* Após essa interação com a superfície, a *Candida* spp. utiliza-se de filamentos extracelulares para sua fixação. Nesse momento inicia-se a fase de colonização, onde ocorre a formação de micro-colônias com posterior formação do biofilme [1].

A adesão sobre a superfície da resina a base de poli (metilmetacrilato) também pode ser influenciada pela presença de compostos orgânicos protéicos, secretados fisiologicamente pelas glândulas salivares maiores e menores [7]. A adsorção destas gliocoproteínas salivares sobre a superfície da resina acrílica caracteriza a formação da película adquirida, que dificulta a adesão de *Candida* spp. [1,8,9] uma vez que a mesma precisa ser removida para que a célula fúngica interaja com o substrato.

A morfologia do biofilme desenvolvido *in vitro* também pode ser influenciada pelo posicionamento do substrato em relação ao meio de cultura. O corpo de prova posicionado de forma horizontal formaria biofilme apenas na face superior, diferentemente de um corpo de prova posicionado de forma vertical, uma vez que ambas as faces estariam expostas ao meio de cultura. Como conseqüência ocorreria um maior consumo de nutrientes podendo levar a um menor desenvolvimento de biomassa. Outra possibilidade seria a força gravitacional que atuaria em diferentes sentidos sobre o biofilme.

Tendo em vista o fato que em certas condições, a estrutura de biofilmes de *C. albicans* podem ser influenciada por fatores externos faz-se necessário a investigação desta condições comumente encontradas tanto nos ensaios *in vitro* quanto nos pacientes portadores de prótese dental acometidos por candidose.

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo possui como objetivo principal verificar a morfologia de biofilmes de *C. albicans* sobre a superfície de resina de poli (metilmetacrilato) na presença de saliva e diferentes posicionamentos do substrato (horizontal ou vertical) no meio de cultura.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Preparo dos espécimes em resina acrílica

Uma resina a base de poli (metilmetacrilato) foi usada na confecção dos espécimes. Discos em cera nas dimensões de 10 mm diâmetro X 2,0 mm espessura foram confeccionados a partir de molde em aço inox de mesmas dimensões. Esses discos foram incluídos em muflas metálicas, dando origem a moldes em gesso nos quais as resinas acrílicas foram processadas após proporção, manipulação e polimerização conforme as instruções do fabricante. Na seqüência, visando simular a textura da face interna de uma prótese total ou parcial removível, os corpos de prova receberam acabamento com lixa d'água nº 600, seguido de polimento com pedra pomes e branco de espanha em disco de feltro durante 1 minuto. Após o acabamento e polimento, os espécimes em resina a base de poli (metilmetacrilato) permaneceram 48 h em água destilada deionizada estéril para liberação do monômero residual [9-11].

3.2 Análise da superfície dos corpos de prova

3.2.1 Rugosidade de superfície

A mensuração da rugosidade foi realizada com o auxílio do rugosímetro, com o diâmetro da ponta ativa de 2 μm, precisão de 0,01 μm de resolução e velocidade de 0.5 mm/s sob pressão constante de 0,07 N. As leituras foram realizadas em 0,8mm ao longo do corpo de prova, em temperatura ambiente. Foram realizadas três mensurações em diferentes locais de cada espécime e a média aritmética calculada a partir dos três valores obtidos foi o valor de rugosidade superficial para o referido [9,11,12].

3.2.2 Energia livre de superfície

Foi realizada a mensuração do ângulo de contato formado entre a superfície do espécime e a gota séssil de água destilada e deionizada [9-11]. Foram utilizados 15 µL de água destilada deionizada estéril que foram depositados com o auxilio de uma pipeta, que foi posicionada de forma que o longo eixo da ponteira ficou perpendicular à superfície do espécime 9,11. A imagem de cada gota séssil foi capturada, imediatamente, por uma máquina digital Mavica CD350 em até 10 seg. após a deposição, em posição padronizada para todas as tomadas realizadas. O ângulo de contato formado entre a superfície da resina e a gota depositada foi mensurado pela leitura da imagem capturada no programa Auto Cad 2005, sendo que, para todos os espécimes, essa mensuração partiu do ponto de intercessão resina-água-ar. Os testes foram conduzidos à temperatura (23 ^{O}C) e umidade constantes.

O valor do ângulo de contato obtido foi computado na fórmula [11]

$$\cos(\Theta) = -1\frac{\gamma l - 2\sqrt{\gamma l \gamma s}\exp^{-\beta(\gamma l-\gamma s)^2}}{\gamma l}$$

Para cada espécime, três gotas de líquido foram depositadas, e a média aritmética dos três ângulos de contato obtidos foi o valor do ângulo de contato do espécime em questão. Foram utilizados somente os espécimes que apresentarem valores de rugosidade de superfície e energia livre de superfície com ± 5% do valor da média. Desta maneira estas propriedades não apresentaram interferência sobre a formação de biofilmes. Após a mensuração da rugosidade de superfície e energia livre de superfície, os espécimes foram esterelizados por imersão em NaOCl a 0,05% sob agitação por três minutos, em seguida lavados por 10 min. com 200 ml de água destilada deionizada estéril. Este processo de eliminação dos resíduos de NaCl foi repetido 4 vezes. Após esse procedimento os espécimes foram armazenados em água destilada até o momento de utilização. A certificação de sua esterilização foi feita por cultura microbiológica.

3.3 Tratamentos de Superfície

3.3.1 Preparo da saliva humana total

Um voluntário saudável, sem uso de antibióticos, antifúngicos ou anti-sépticos bucais nos últimos 03 meses, após concordar com o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da faculdade, doou a saliva estimulada pela

mastigação de papel parafinado Parafilm. Foram coletados 50 mL de saliva, em tubo de ensaio estéril, que foram mantidos em um recipiente com gelo até o processamento. A saliva foi centrifugada (10,000 g, 10 min. à 4 ℃) e em seguid a filtrada por membrana e acondicionada em recipiente estéril. Neste recipiente foram adicionados os corpos de prova estéreis em acrílico durante 30 min., para formação de película adquirida. Após este período os espécimes foram removidos com pinça estéril e utilizados no ensaio de formação de biofilme [6,9].

3.4 Grupos de Estudo

A ação da saliva e do posicionamento do corpo de prova foi avaliada através de 4 grupos: G1) presença de saliva e corpo de prova posicionado horizontalmente; G2) presença de saliva e corpo de prova posicionado verticalmente; G3) ausência de saliva e corpo de prova posicionado horizontalmente e, G4) ausência de saliva e corpo de prova posicionado verticalmente.

3.5 Análise Microbiológica

Foram utilizadas neste estudo a cepa de referência *Candida albicans* ATCC 90028.

3.6 Reativação das espécies

Os microrganismos foram reativados de suas culturas originais (armazenadas em meio sólido Ágar Sabouraud, a 4 ℃, sob óleo mineral est éril) em 10 mL de meio de cultura Sabouraud a 35 ºC, por um período de incubação de 24 h em atmosfera normal. A partir das colônias obtidas, amostras foram coletadas com alça estéril e suspensas em 170 mL de meio de cultura líquido YNB enriquecido com 50 mM de glucose. Este tubo foi incubado por 18 a 24 h. Após este período, o tubo foi centrifugado e as células “lavadas” duas vezes com PBS estéril. Em seguida, um novo tubo contendo YNB enriquecido com 100 mM de glucose teve a sua turbidez ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro até atingir a mesma absorbância que a registrada pelo padrão 0,5 da Escala de McFarland, com comprimento de onda igual a 530 nm. Este procedimento assegurou uma suspensão para a solução de estoque de 1 x 108 a 5 x 108 células por mL.

3.7 Formação do biofilme

Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço de uma placa para cultura celular de 24 poços recebeu 1,0 mL de meio de cultura YNB enriquecido com 100 mM de glicose estéril e 0,5 mL da suspensão de *Candida* spp. Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos, individualmente, nesses poços em diferentes posições – horizontal ou vertical. As placas contendo os espécimes foram incubadas a 35 ºC por 1 h e 30 min.,[13,14] tempo este correspondente à fase de adesão.

Após o período de adesão, os espécimes foram lavados em 100 mL de PBS estéril para a remoção de microrganismos não-aderidos e debris. Estes espécimes foram em seguida recolocados em novo micro poço onde foi adicionado novo meio de cultura YNB enriquecido com 100mM de glucose estéril. Este conjunto foi novamente incubado a 35 ºC, sendo o meio de cultura substituído a cada 24 h. A análise do biofilme foi realizada após 24, 48 e 72 h de incubação.[7]

3.8 Análise quantitativa do biofilme

A formação dos biofilmes foi analisada quantitativamente conforme a metodologia proposta por Silva *et al. 15*, que baseia-se em uma análise colorimétrica da redução metabólica de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil amino) carbonila]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT), que resulta em uma solução hidrossolúvel de cor marrom.

O número de repetições necessário para cada teste foi definido após análise exploratória dos resultados obtidos no experimento piloto, sendo 3 repetições para cada grupo.

3.9 Análise morfológica do biofilme

3.9.1 Microscopia Confocal a laser

Os biofilmes foram tratados pelos corantes de SYTO-9 e propidium iodide, na qual foi permitida a visualização das células vivas e mortas. Os biofilmes tiveram suas estruturas escaneadas a partir da sua base até ao seu ápice. Uma série de imagens, semelhantes a cortes tomográficos, foram obtidas, sendo cada imagem distanciada em 1 µm. As imagens obtidas pela microscopia foram então avaliadas no programa COMSTAT, que mostrou a interpretação matemática das propriedades estruturais do biofilme, tais como biovolume, rugosidade de superfície e espessura média e máxima do biofilme avaliado**.**

3.9.2 Contagem Celular

A análise da contagem celular foi realizada através da diluição decimal seriada. Em um tubo criogênico contendo 3 ml de PBS estéril foi inserido um espécime com biofilme desenvolvido com o auxílio de uma pinça estéril. Todos os tubos foram sonicados por 30 seg. em uma potência de 7 W. Após a diluição decimal seriada, 20 µl da solução foram depositados sobre uma placa de petri contendo meio de cultura Agar Sabouraud. Após a deposição, as placas foram incubadas em estufa a temperatura de 35 ℃ em aerobiose por 24 h. Após este período, as células foram quantificadas e o resultado expresso em células/mL.

3.9.3 Microscopia Confocal a Laser

Os biofilmes foram tratados pelos corantes de SYTO-9 e propidium iodide, permitindo a visualização das células vivas e mortas. Os biofilmes tiveram suas estruturas escaneadas a partir da sua base até ao seu ápice. Uma série de imagens, semelhantes a cortes tomográficos foi obtida, sendo cada imagem distanciada em 1 µm. As imagens obtidas pela microscopia foram então avaliadas no programa IMAGEJ, permitindo a avaliação tridimensional do biofilme avaliado.

4. RESULTADOS

4.1 Análise metabólica

Os resultados obtidos para a atividade metabólica para os biofilmes de *C. albicans* estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Valores de densidade ótica para atividade metabólica (D.O.) dos biofilmes de *C. albicans* (média ± d.p.; n=9).

	Horizontal (§)		**Vertical (¥)**	
	película	**sem película**	**película**	**sem película**
Adesão	3,7 (0,1) A, a	3,6 (0,1) A, a	2,2 (0,3) A, a	1,9 (0,1) A, a
24 horas	3,8 (0,1) A, a	3,8 (0,2) A, a	3.5 (0,3) A, b	2,5 (0,6) B, b
48 horas	3,8 (0,2) A, a	3,7 (0,2) A, a	3,3 (0,2) A, b	3,3 (0,3) A, c
72 horas	3,8 (0,1) A, a	3,7 (0,1) A, a	3,5 (0,1) A,b	2.1 (0,2) B, ab

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante entre a presença ou ausência de película adquirida para cada período avaliado. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante entre os períodos avaliados. Símbolos distintos indicam diferença estatisticamente significante entre o posicionamento do substrato.

4.2 Contagem celular

Os resultados obtidos para a contagem celular para os biofilmes de *C. albicans* estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2: Número de células (cel/mL) dos biofilmes de *C. albicans* avaliados (média ± d.p.; n=9).

	Horizontal (§)		**Vertical (¥)**	
	película	**sem película**	**película**	**sem película**
Adesão	$0.7 \pm 0.05 \times 10^7$ A,a	$0.6 \pm 0.2 \times 10^7$ A,a	$0.1 \pm 0.06 \times 10^7$ A,a	$0.01 \pm 0.02 \times 10^7$ A,a
24 horas	$6.8 \pm 0.9 \times 10^7$ A,b	$5.8 \pm 1.4 \times 10^7$ A,b	$0.3 \pm 0.04 \times 10^7$ A,b	$0.2 \pm 0.08 \times 10^7$ A,ab
48 horas	$5.0 \pm 1.5 \times 10^7$ A,b	$5.3 \pm 1.2 \times 10^7$ A,b	$0.3 \pm 0.1 \times 10^7$ A.ab	$0.3 \pm 0.09 \times 10^7$ A,b
72 horas	$3.5 \pm 0.9 \times 10^7$ A,bc	$4.1 \pm 1.5 \times 10^7$ A,b	$1.0 \pm 0.4 \times 10^7$ A,c	$0.4 \pm 0.3 \times 10^7$ B,b

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante entre a presença ou ausência de película adquirida para cada período avaliado. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante entre os períodos avaliados. Símbolos distintos indicam diferença estatisticamente significante entre o posicionamento do substrato.

4.3 Microscopia Confocal a Laser

As imagens representativas dos biofilmes de *C. albicans* estão apresentadas nas fig. 1 e 2.

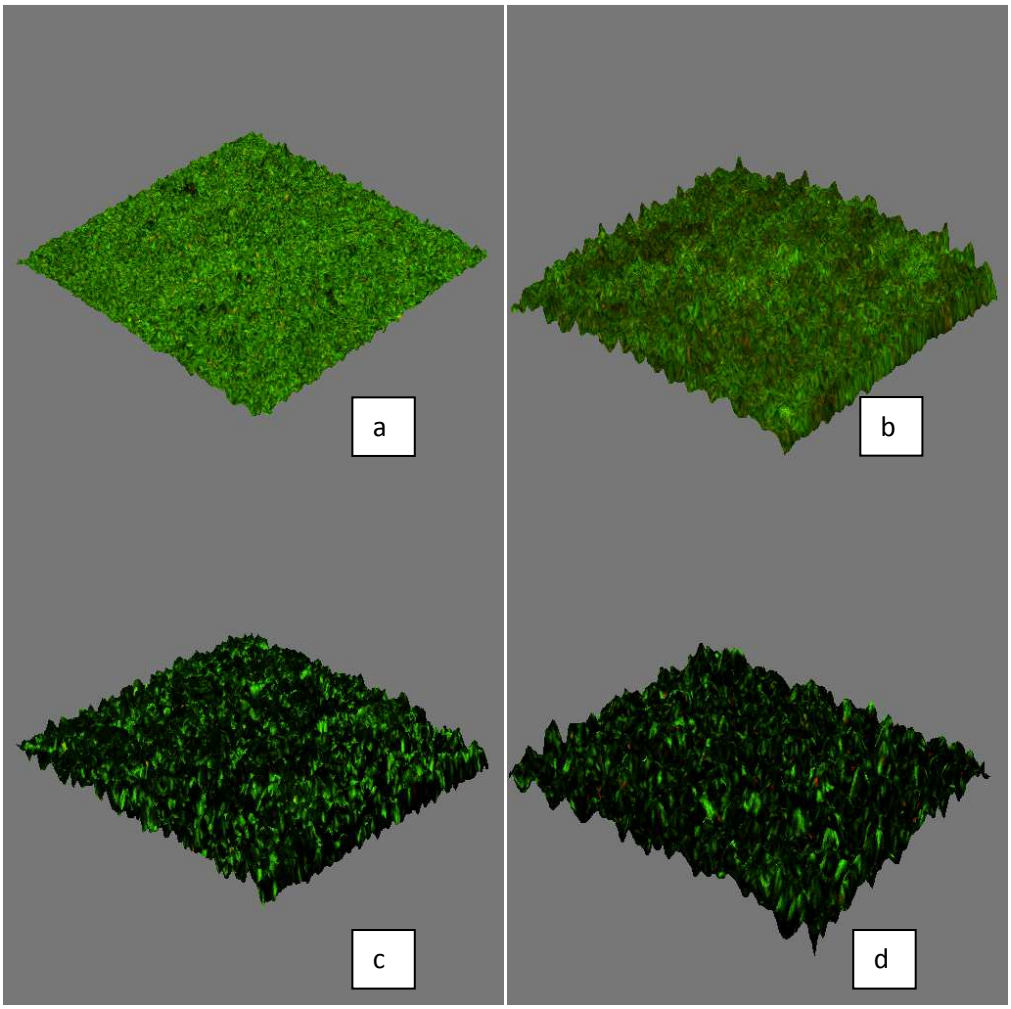

Fig.1 – Imagem representativa para os biofilmes desenvolvidos com presença de película adquirida. a- adesão; b- 24 h; c- 48 h; 72 h.

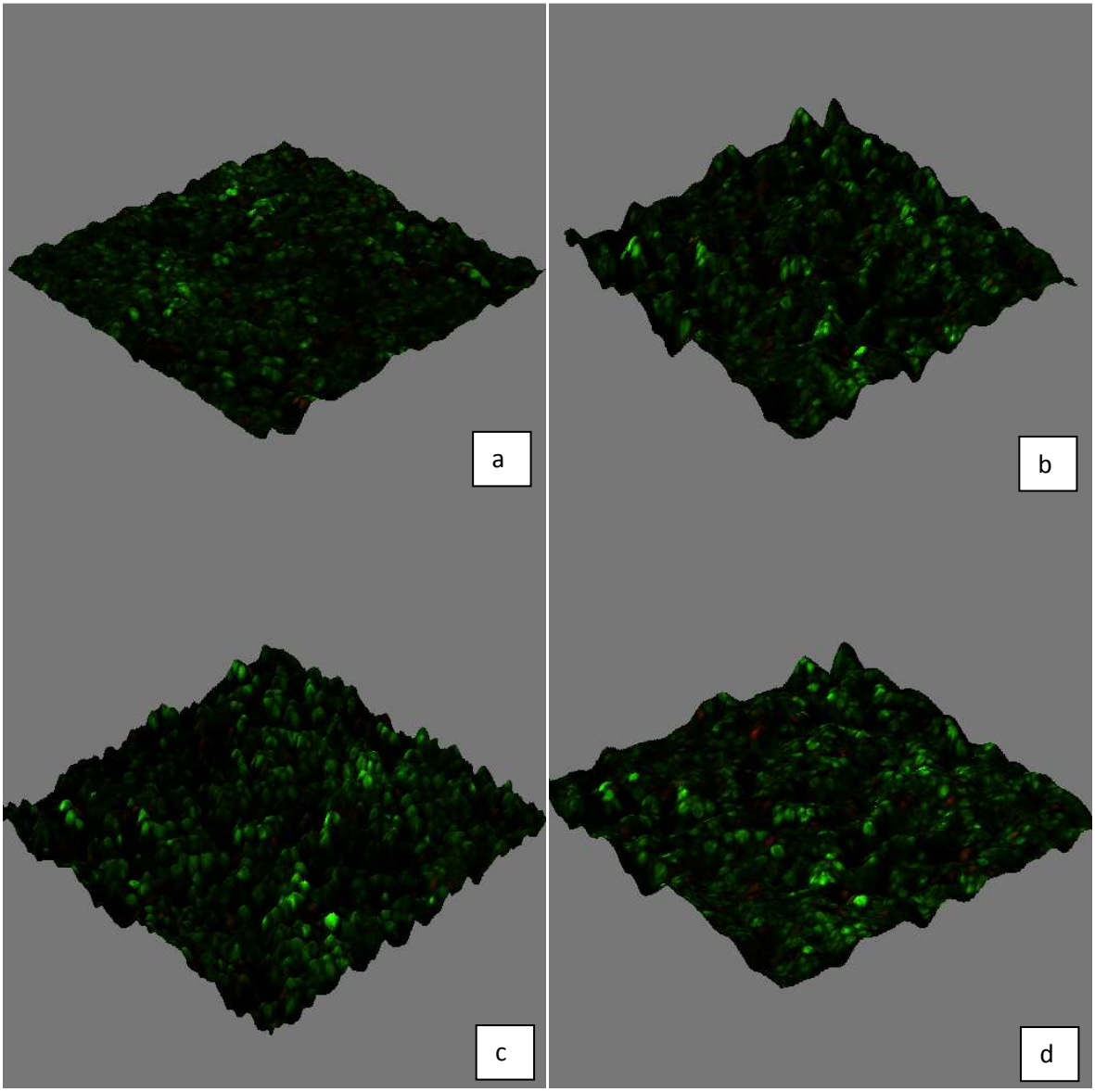

Fig.2 – Imagem representativa para os biofilmes desenvolvidos na ausência de película adquirida. a- adesão; b- 24 h; c- 48 h; 72 h.

5. DISCUSSÃO

Na candidose, ou estomatite induzida por prótese, a *Candida albicans* atua como o patógeno mais importante e mais virulento [1-3] e sua associação como principal patógeno está diretamente relacionada a sua eficiência de e aderir e colonizar superfícies de próteses dentais removíveis [4,5]. Desta maneira, é importante conhecer o processo de colonização e desenvolvimento de biofilmes de *Candida albicans.*

O processo de adesão sobre a superfície da resina a base de poli (metil metacrilato) inicia-se com a aproximação do microrganismo, e através da interação entre a parede celular da *Candida albicans* e a superfície do substrato ocorre a adesão inicial [1]. Após essa interação com a superfície, este microrganismo utiliza filamentos extracelulares para se fixar. Nesse momento se dá o início da fase de colonização, onde ocorre a formação de micro-colônias e em condições favoráveis, ocorre a posterior formação de biofilme [1]. O desenvolvimento do biofilme inicia-se a partir das micro colônias aderidas, onde as células basais multiplicam-se formando uma firme estrutura que a mantém aderida ao substrato [6]. A formação destas colônias com várias camadas celulares ocorre concomitantemente a liberação de polissacarídeos extracelular, formando uma matriz que é moldada em função do fluxo de nutrientes do meio em que se encontra o biofilme [7-9]. Nesta complexa estrutura, após atingir o ápice do desenvolvimento em aproximadamente 72 horas e uma vez detectada a escassez de nutrientes, moléculas químicas ligadas ao "*quorum sensing*" são liberadas pelas células das camadas intermediárias e basais, fazendo com que as células das camadas superficiais do biofilme de *Candida albicans* desprendam-se e, uma vez lançada ao meio, tem a função de gerar novas colônias e o desenvolvimento de novos biofilmes [6].

Desta maneira, neste estudo verificou-se que o posicionamento do substrato na posição vertical foi responsável por apresentar biofilmes com menores valores de bioatividade e contagem celular. Isto pode ser explicado pelo fato de que o biofilme nesta posição teria suas células que se destacam atraídas pela gravidade, não alcançando e colonizando a superfície do substrato. Desta maneira o desenvolvimento do biofilme foi oriundo do desenvolvimento celular e não apenas da deposição celular. Esta mesma redução na quantificação celular explicaria o fenômeno de redução da bioatividade.

Na cavidade oral, a adesão inicial de *Candida albicans* sobre a resina de PMMA é precedida pela formação da película adquirida que consiste primariamente de compostos orgânicos protéicos secretados fisiologicamente pelas glândulas salivares (Radford *et al*.,1999; Moura *et al*., 2006). A manifestação clínica da estomatite protética apresenta uma mucosa

edemaciada com injúrias do epitélio oral que pode ocasionar micro-hemorragias e consequentemente presença de proteínas plasmáticas que também podem se depositar sobre a resina de PMMA formando uma película adquirida. A formação de películas sobre a superfície da prótese está diretamente relacionada à sua capacidade de molhamento que é regulada pela energia livre de superfície por meio de interações ácido-base aonde o componente ácido do líquido (Y_l^+) na interface interage com o componente base do sólido (Y_s^-) e o componente básico do líquido (Y_l^-) interage com o componente ácido do sólido (Y_s^+) (Sipahi *et al*., 2001). Desta maneira, a presença da película adquirida oriunda das proteínas salivares representaria um obstáculo para adesão inicial da células de *C. albicans*, conforme os resultados apresentados neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, foi possível concluir que o diferente posicionamento do substrato foi capaz de interferir no desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans.*

7. REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Egusa H, Ellepola AN, Nikawa H, Hamada T, Samaranayake LP. Exposure to subtherapeutic concentrations of polyene antifungals suppresses the adherence of Candida species to denture acrylic. Chemotherapy 2000;46(4):267-74.
3. Nikawa H, Jin C, Hamada T, Makihira S, Kumagai H, Murata H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and Candida albicans in vitro. Part II. Effects on fungal colonization. J Oral Rehabil 2000;27(2):124-30.
4. 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.

5. de Jong HP, de Boer P, Busscher HJ, van Pelt AW, Arends J. Surface free energy changes of human enamel during pellicle formation. An in vivo study. Caries Res 1984;18(5):408-15.
6. 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.
7. Almstahl A, Wikstrom M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. Oral Microbiol Immunol 2001;16(6):345-52.
8. Waters MG, Williams DW, Jagger RG, Lewis MA. Adherence of Candida albicans to experimental denture soft lining materials. J Prosthet Dent 1997;77(3):306-12.
9. 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.