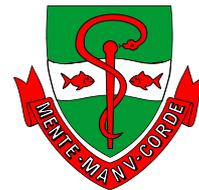




UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



“Influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície da resina a base de poli (metilmetacrilato) no desenvolvimento e estrutura do biofilme de *Candida albicans*”

Aluna: Flávia Carvalho Viu

Orientador: Prof. Dr. Wander José da Silva

Co-orientador: Prof. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury

Piracicaba

2012

Flávia Carvalho Viu

“Influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície da resina a base de poli (metilmetacrilato) no desenvolvimento e estrutura do biofilme de *Candida albicans*”

Trabalho de conclusão de Curso apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: **Prof. Dr. Wander José da Silva**

Co-orientador: **Prof. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

V836i Viu, Flávia Carvalho, 1990-
Influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície da resina a base de poli (metilmetacrilato) no desenvolvimento e estrutura do biofilme de *Candida albicans* / Flávia Carvalho Viu. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Wander José da Silva.

Coorientador: Altair Antoninha Del Bel Cury.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia. 2. Prótese dentária. 3. Adesão. I.
Silva, Wander José da. II. Del Bel Cury, Altair
Antoninha, 1948- III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV.
Título.

Dedicatória

Dedico o meu trabalho, ao meu pai, Reinaldo, minha mãe, Janete, ao meu irmão Vitor e aos meus amigos que estiveram ao meu lado nesse percurso.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Wander José da Silva por ter me dado à oportunidade da iniciação científica, por ter dado todo o suporte necessário e por todo o aprendizado adquirido nessa experiência, além de um ótimo orientador se demonstrou muito amigo nos momentos mais difíceis.

Agradeço também a Letícia Machado Gonçalves que foi uma ótima parceira de trabalho, com muita paciência sempre me ajudou, me ensinou muito além de ter se tornado uma grande amiga.

Um especial agradecimento aos meus familiares, pai, mãe e irmão que me deram educação para ser quem sou hoje, o exemplo a ser seguido de dedicação e esforço para conquistar o que desejamos, pelo suporte emocional e moral, pela preocupação e pelo incentivo. Sou eternamente grata.

Resumo

Objetivo: Avaliar a influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície do substrato de resina a base de poli (metilmetacrilato) no desenvolvimento e estrutura do biofilme de *Candida albicans*. **Materiais e métodos:** Para isto, discos (10mm de diâmetro e 2mm de espessura) de resina acrílica a base de poli (metilmetacrilato) ou material reembasador foram confeccionados de acordo com as recomendações do fabricante. A alteração da rugosidade de superfície foi obtida de acordo com o tipo de acabamento/polimento empregado. A alteração na energia livre de superfície foi obtida com a deposição protéica de proteínas salivares ou plasmáticas. Em seguida, estes espécimes tiveram a rugosidade de superfície e a energia livre de superfície mensurada sendo posteriormente divididos aleatoriamente de acordo com os grupos experimentais. Sobre a superfície destes espécimes foram desenvolvidos biofilmes de *Candida albicans* por um período de adesão, 24, 48 e 72 horas. A avaliação dos biofilmes foi feita por meio da contagem de células, após sonicação dos espécimes e semeadura em meio de cultura; a bioatividade foi mensurada por meio do teste de XTT e a estrutura do biofilme de *Candida albicans* foi mensurada com auxílio de microscopia de varredura confocal a laser. **Resultados:** A alteração da rugosidade de superfície afetou a estrutura do biofilme de *Candida albicans* na fase de adesão, no entanto, não afetou a estrutura do biofilme desenvolvido de 48 horas. Já a alteração da energia livre de superfície por meio de deposição de proteínas salivares e/ou plasmáticas alterou a estrutura do biofilme de *Candida albicans* nas fases de adesão e 48 horas. **Conclusão:** A rugosidade da superfície e a energia livre são capazes de modificar a estrutura do biofilme de *Candida albicans*.

Palavras-chave: Adesão celular, Biofilmes, *Candida albicans* e Rugosidade de superfície.

Abstract

Objective: To evaluate the influence of surface roughness and surface free energy of the substrate resin based on poly (methyl methacrylate) in the development and structure of biofilms of *Candida albicans*. **Materials and methods:** For this, discs (10mm in diameter and 2mm thick) acrylic resin base of poly (methylmethacrylate) or reliner material were prepared according to the manufacturer's recommendations. The alteration of surface roughness was obtained according to the type of finishing / polishing employed. The change in surface free energy was obtained with protein deposition of salivary proteins or plasma. Then these specimens had a surface roughness and surface free energy measured being randomly divided according to the experimental groups. On the surface of these specimens were *Candida albicans* biofilms developed over a period of accession, 24, 48 e72 hours. The evaluation of biofilms was performed by counting cells after sonication of specimens and seeding in culture medium; bioactivity was measured by XTT test and biofilm structure of *Candida albicans* was measured with the aid of scanning confocal microscopy laser. **Results:** The change in surface roughness affect the structure of the biofilm during *Candida albicans* adhesion, however, did not affect the structure of the biofilm developed 48 horas. Já changing the surface free energy by deposition of salivary proteins and / or plasma alter the structure of the biofilm phases of *Candida albicans* adhesion and 48 hours. **Conclusion:** The roughness of the surface free energy and are able to modify the structure of the biofilm of *Candida albicans*.

Keywords: Cell Adhesion, *Candida albicans*, Surface roughness and Biofilms.

Sumário

1. Introdução e Revisão de literatura	1
2. Proposição	3
3. Materiais e Método	4
4. Resultados	13
5. Discussão	24
6. Conclusão	29
7. Referencias Bibliográficas	30
Anexo I	32

1. Introdução e Revisão de Literatura

A *Candida albicans* é encontrada na cavidade oral aderida na dentição, língua, bochecha e mucosa palatal, além de materiais restauradores e próteses dentais removíveis, com uma prevalência de até 75% [1]. Em pessoas com saúde geral e bucal estabelecida a presença de *Candida* spp. raramente causa alguma patologia, contudo, pode tornar-se patogênica quando na presença de fatores predisponentes de origem sistêmica e/ou oral como imunossupressão, função salivar deficiente, diabetes mellitus e dieta rica em carboidratos [2-4].

Em portadores de próteses dentais removíveis, a *Candida* spp. pode desencadear a estomatite induzida por prótese, patologia caracterizada por um processo inflamatório instalado na mucosa oral em contato com a prótese, conferindo-lhe um aspecto edemaciado e eritematoso [5, 6]. Considerada o principal agente etiológico da estomatite induzida por prótese [7, 8], a *Candida albicans* tem alta capacidade de aderir e colonizar facilmente as bases das próteses removíveis formando comunidades microbianas conhecidas como biofilmes.

Dentre os fatores que podem influenciar o processo de adesão e colonização de espécies de *Candida* sobre a superfície de próteses dentais removíveis estão às características de superfície dos materiais utilizados na confecção destas próteses, como a energia livre de superfície e a rugosidade de superfície.

A energia livre de superfície indica a capacidade de molhamento de um sólido, sendo mensurada pelo ângulo de contato formado entre o sistema sólido/líquido [9, 10]. Estudos demonstram que substratos com níveis elevados de energia livre de superfície induzem a uma maior adesão de microrganismos [11-13].

As superfícies com maior rugosidade de superfície aumentam a adesão de *Candida* [14, 15] pois as irregularidades promovem retenção e proteção dos microrganismos contra forças que tendem a deslocá-los [1, 16]. Assim, quando a resina acrílica apresenta rugosidade superficial acima de 0,02 μm , sua superfície torna-se passível de colonização [7, 17].

Desta forma, fatores importantes no processamento das próteses dentais removíveis, como acabamento e polimento, devem ser adequadamente executados, pois a *Candida albicans* pode se alojar facilmente nas irregularidades

de superfícies [18]. Além destes fatores, a adesão sobre o substrato pode ser influenciada pela presença de compostos orgânicos protéicos, secretados fisiologicamente pelas glândulas salivares [10]. A adsorção destas glicoproteínas salivares sobre a superfície da resina acrílica caracteriza a formação da película adquirida o que dificulta a adesão de *Candida* spp. [7, 10].

Assim, considerando a alta prevalência de *Candida albicans* em usuários de próteses dentais removíveis faz-se necessário avaliar o papel das características de superfície no desenvolvimento do biofilme sobre a superfície de resina a base de poli (metilmetacrilato).

2. Proposição

O objetivo geral do presente trabalho será verificar a influência da rugosidade de superfície e energia livre de superfície de uma resina a base de poli (metilmetacrilato) e um material reembasador permanente na estrutura dos biofilmes de *Candida albicans*.

Como objetivo específico, este estudo pretende quantificar o biofilme e avaliar sua morfologia pela alteração dos seguintes fatores:

- Alteração da rugosidade de superfície por meio do polimento;
- Modificação da energia livre de superfície do tratamento da resina a base de poli (metilmetacrilato) e material reembasador com plasma humano ou saliva total humana.

3. Materiais e método

3.1. Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. As etapas de confecção dos espécimes e análise da rugosidade de superfície e energia livre de superfície foram realizadas no Laboratório de Prótese Parcial Removível pertencente ao Departamento de Prótese e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, que possui equipamento e infra-estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

As análises microbiológicas de desenvolvimento e estrutura do biofilme de *Candida albicans* foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Oral pertencente à Área de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas e no Laboratório de Microscopia Confocal de Varredura a Laser ambos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP que dispõem igualmente de toda estrutura necessária para tal fim.

3.2. Materiais

Os materiais e equipamentos que foram utilizados nesse trabalho estão descritos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Materiais utilizados no presente estudo.

Produto	Fabricante
Resina a base de poli(metilmetacrilato) Lucitone 550	Dentsply Ind. e Com. Ltda –Rio Janeiro, RJ, BR.
Reembasador resiliente Super-Soft	GC America, Inc., Alsip, IL, USA
Meio de Cultura Agar Sabouraud	Difco, Detroit, USA
Meio de Cultura Sabouraud Caldo	Difco, Detroit, USA
Meio de Cultura YNB	Difco, Detroit, USA
Placa de Petri descartável estéril	J. Prolab São José dos Pinhais, PR, BR
Corantes de SYTO-9 e propidium iodide (kit Molecular Probes' LIVE/DEAD	Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg, USA

BacLight Bacterial Viabilit)	
XTT	Sigma, Aldrich Chemie, Germany
PBS	Sigma, Aldrich Chemie, Germany

Tabela 3: Equipamentos necessários para o estudo.

Equipamento	Fabricante
Microscópio Confocal de Microscopia a laser	Leica Microsystems ou Zeiss ou Olympus (a ser definido futuramente)
Ultramicrótomo MT2C	Research & Manufacturing Co., Tucson, AZ, USA
Estufa de Cultura 502	Fanem, São Paulo, SP, Brasil
Microcentrifuga MR23i	Jouan, Inc., Winchester, VA, USA
Rugosímetro Surf Corder SE 1700	KosakaLab, Tóquio, Japão
Agitador de tubos AP 56	Phoenix Technologies Ltd, Milpitas, CA, USA
Espectofotômetro Spectronic 20	Bausch & Lomb Inc., Rochester, NY, USA
Câmera Fotográfica Canon EOS digital	Canon INC, Tóquio, Japão
Centrífuga J2-21	Beckham Coulter, Inc., Fullerton, CA
Software Auto Cad 2005	Autodesk, San Rafael, Ca, USA
Ultra –son Thornton T740	Thornton-Inpec Eletrônica LTDA, Vinhedo,. Brazil
Politriz APL-4	Arotec, Cotia, SP, Brasil

3.3. Metodologia

3.3.1. Delineamento Experimental

Corpos de prova circulares (10mm de diâmetro e 2mm de espessura) confeccionados em resina a base de poli (metilmetacrilato) ou reembasador permanente foram confeccionados de acordo com as instruções do fabricante. Após a confecção os corpos de prova foram aleatoriamente divididos em grupos conforme o tipo de acabamento e polimento que receberam. Os corpos de prova destinados ao estudo da influência da rugosidade de superfície foram divididos conforme os

grupos: R1, PMMA + acabamento com lixa 600 + polimento com Pedra Pomes e branco de Espanha (0,30); R2, PMMA + acabamento com lixa 600 (0,11); R3, PMMA + acabamento com lixa 1200 + polimento com Pedra Pomes e branco de Espanha (0,17); R4, PMMA + acabamento com lixa 1200 (0,12); R5, Material Reembasador sem acabamento (0,31); R6, Material Reembasador + acabamento e polimento (0,13). Os corpos de prova destinados ao estudo da alteração na energia livre de superfície foram divididos de acordo com os grupos: S1, PMMA sem tratamento; S2, PMMA + tratamento com plasma humano; S3, PMMA + tratamento com saliva total humana; S4, Material Reembasador sem tratamento; S5, Material Reembasador + tratamento com plasma humano e S6, Material Reembasador + tratamento com saliva total humana. Após o tratamento de superfície, os corpos de prova foram alocados em placas de 24 poços estéreis onde foi depositada uma alíquota de inóculo de *Candida albicans* com concentração celular conhecida. Após o período de adesão, os corpos de prova foram lavados com PBS estéril e então novo meio de cultura adicionado. Após o período de adesão, 24, 48 e 72 horas de desenvolvimento, o biofilme formado sobre os corpos de prova foram analisados quanto à quantidade de células, bioatividade e propriedades estruturais.

3.3.2. Confecção dos espécimes em PMMA

Espécimes de resina a base de poli (metilmetacrilato) polimerizada por banho de água (Lucitone 550, Dentsply Ind. e Com. Ltda – Rio Janeiro, RJ, BR) em forma de disco com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram confeccionados utilizando-se uma mufla de aço inox específicos, contendo orifícios nestas dimensões. Durante a confecção dos espécimes a proporção, manipulação e polimerização da resina foram realizadas conforme instruções do fabricante.

3.3.3. Confecção dos espécimes com Material Reembasador

Espécimes de resina a base de poli (metilmetacrilato) polimerizada por banho de água (Lucitone 550 fabricada por Dentsply Ind. e Com. Ltda – Rio Janeiro, RJ, BR.) em forma de disco com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura foram utilizados como base para o Material Reembasador. Em seguida, os discos foram reembasados com o material reembasador Super-Soft fabricado por GC America,

Inc., Alsip, IL, USA., manipulados segundo as recomendações dos fabricantes. Para isto, discos de cera nas dimensões de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram confeccionados a partir de molde em aço inox de mesmas dimensões. Estes discos foram incluídos em mufla metálica, dando origem a moldes em gesso, dentro destes moldes foram posicionados os discos da resina Lucitone 550 nas dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura e sobre eles 1 mm de espessura do material reembasador Super-Soft que foi proporcionado, manipulado e processado conforme as instruções do fabricante.

3.3.4. Acabamento e Polimento dos espécimes

Os corpos de prova em resina acrílica e material reembasador foram submetidos a acabamento com lixa d'água n° 320, 400 e 600. Alguns grupos de estudo foram submetidos ao acabamento adicional com lixa d'água n° 1200. Após o acabamento os corpos de prova receberam polimento com pedra pomes e branco de Espanha em disco de feltro durante 1 minuto. Após o acabamento e polimento, os espécimes foram armazenados em água destilada a 37 °C por 48 h para eliminação do monômero residual.

3.4. Análise da superfície dos espécimes

3.4.1. Rugosidade de superfície

A rugosidade de superfície foi mensurada com o rugosímetro (Surfcorder SE 1700 Kozaka Industry, Kozaka, Japan) com o diâmetro da ponta ativa de 2 µm, precisão de 0,01 µm de resolução e velocidade de 0,5 mm/s sob pressão constante de 0,07 N. As leituras foram realizadas em 0,8 mm ao longo da superfície do espécime, em temperatura ambiente. Foram realizadas três mensurações em diferentes locais de cada espécime e a média aritmética foi calculada, considerando o valor obtido a rugosidade de superfície para o referido espécime [10, 19, 20].

3.4.2. Energia livre de superfície (ELS)

A energia livre de superfície (erg/cm^2), foi mensurada pela deposição de $15\mu\text{L}$ de água destilada deionizada sobre a superfície dos espécimes polidos e não polidos. A pipeta foi posicionada de forma que a ponteira ficará perfeitamente vertical em relação à superfície de forma a não permitir formar nenhum ângulo [10]. A imagem da gota séssil foi capturada, imediatamente, por uma máquina Canon EOS Rebel Digital (Canon Inc. Tokyo, Japan), com posicionamento padronizado para as tomadas que foram realizadas. O ângulo de contato foi mensurado pela leitura da imagem capturada no programa Auto Cad R14, dos limites esquerdos das fotografias ao ponto de intercessão espécime-água-ar. Para cada espécime, três gotas de líquido foram depositadas em locais diferentes, sendo usado, portanto, valor médio das três mensurações para cada superfície. A energia de superfície foi calculada usando o $\cos \Theta$ do ângulo de contato na fórmula abaixo:

$$\cos(\Theta) = -1 \frac{\gamma_l - 2\sqrt{\gamma_l \gamma_s} \exp^{-\beta(\gamma_l - \gamma_s)^2}}{\gamma_l}$$

Finalizando as mensurações da energia livre e rugosidade de superfície dos espécimes, estes foram divididos aleatoriamente para comporem os 2 grupos, representando cada uma das condições experimentais.

3.5. Remoção dos contaminantes dos espécimes

Após a mensuração da rugosidade de superfície e energia livre de superfície, os espécimes foram esterilizados por imersão em NaOCl a 0,05% sob agitação por três minutos, em seguida lavados por 10 minutos 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.

3.6. Tratamentos de superfície

3.6.1. Preparo da saliva total humana

A saliva humana total foi coletada de um voluntário, sendo considerado como critério de inclusão a necessidade de gozar de boa saúde geral. Foram excluídos os voluntários que fizerem relato do uso de antibióticos, anti-sépticos bucais, bem como algum outro medicamento que possa afetar a composição ou o fluxo salivar nos últimos três meses [21, 22]. Após concordar e assinar Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP, o voluntário doará saliva estimulada pela mastigação de papel parafinado Parafilm® (American Co; Greenwich, Ct, USA), a qual foi coletada em tubo de ensaio estéril e mantida em gelo até o processamento. A saliva coletada foi centrifugada (10,000g, 5 min a 4°C) e o sobrenadante foi removido e utilizado imediatamente.

3.6.2. Preparo do plasma humano

O plasma humano foi doado pelo HEMOAM – Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Após o descongelamento do plasma humano, o mesmo foi utilizado quando atingir a temperatura ambiente.

3.6.3. Tratamento de Superfície

Uma alíquota de 2 mL do plasma humano ou saliva humana total ou saliva/plasma (1:1; v/v) será adicionada individualmente em um micro poço da placa estéril de poliestireno com 24 poços (Bio-one; Greiner, Frickenhausen, Alemanha) para cultura celular. Foi adicionado na sequência um corpo de prova previamente desinfetado permanecendo imerso por 30 minutos sob agitação em temperatura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ para a formação de película adquirida. Após este período o espécime foi removido com pinça estéril e utilizado no ensaio de formação de biofilme [10, 19].

3.6.4. Grupos de Estudo

A ação da rugosidade de superfície sobre o desenvolvimento do biofilme foi avaliada de acordo com os seguintes grupos de estudo: R1, PMMA + acabamento com lixa 600 + polimento com Pedra Pomes e branco de Espanha; R2, PMMA + acabamento com lixa 600; R3, PMMA + acabamento com lixa 1200 + polimento com Pedra Pomes e branco de Espanha ; R4, PMMA + acabamento com lixa 1200; R5, Material Reembasador sem acabamento e R6, Material Reembasador + acabamento e polimento Os corpos de prova destinados ao estudo da alteração na energia livre de superfície foram divididos de acordo com os grupos: S1, PMMA sem tratamento; S2, PMMA + tratamento com plasma humano; S3, PMMA + tratamento com saliva total humana; S4, Material Reembasador sem tratamento; S5, Material Reembasador + tratamento com plasma humano e S6, Material Reembasador + tratamento com saliva total humana.

3.7. Formação do Biofilme

Foram utilizadas neste estudo cepas de *Candida albicans* referência ATCC 90028. Estas cepas encontram-se armazenadas na fungiteca da área de Prótese Parcial Removível.

3.7.1. Reativação das espécies

Os microrganismos foram reativados de suas culturas originais (armazenadas em meio sólido Ágar Sabouraud, a 4°C, sob óleo mineral estéril) em 10 mL de meio de cultura Sabouraud a 35°C, por um período de incubação de 24 horas em atmosfera normal. A partir das colônias obtidas, amostras foram coletadas com alça estéril e suspensas em 50 mL de meio de cultura líquido YNB enriquecido com 50 mM de glucose. Este tubo será incubado por 18 a 20 horas. 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 absorbância de 0.250 com comprimento de onda igual a 530 nm. Este procedimento assegurou uma suspensão para a solução de estoque entre 1×10^7 e 5×10^7 células por mL.

3.7.2. Formação do biofilme

Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço de uma placa para cultura celular de 24 poços receberá 2,0 mL de meio de cultura YNB enriquecido com 100 mM de glicose com a suspensão entre 1×10^7 e 5×10^7 cel/mL de *Candida albicans*. Os espécimes com a superfície tratada com uma proteína foram aleatoriamente distribuídos, individualmente, nesses micro poços. As placas contendo os espécimes foram então incubadas a 35°C por 90 min [23, 24], tempo este correspondente à fase de adesão.

Após o período de adesão, os espécimes foram lavados com 1 mL de PBS estéril para a remoção de microrganismos não-aderidos e debris. Estes espécimes foram em seguida recolocados em novo micro poço onde foram adicionados novos 2,0 mL de meio de cultura YNB enriquecido com 100 mM de glucose estéril. Este conjunto foi novamente incubado a 35°C, sendo o meio de cultura substituído a cada 24 horas. A análise do biofilme foi realizada após o período de adesão, 24, 48 e 72 horas de incubação.

3.8. Análise quantitativa do biofilme

3.8.1. Bioatividade

A formação dos biofilmes foi analisada quantitativamente conforme a metodologia proposta por da Silva *et al.*, 2008 [19] 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.

Os espécimes com biofilme foram removidos e transferidos para novas placas de cultura celular onde cada poço receberá 2,0 mL da formulação de XTT. As placas com os poços foram incubados protegidas da luz por 3 horas a 35°C. Após este período o conteúdo líquido do poço foi transferido e centrifugado (5 min, 6000 g). O sobrenadante foi então transferido para cubetas plásticas e a redução do XTT foi determinada pela absorbância registrada com espectrofotômetro próprio para placas com comprimento de onda de 492 nm.

3.8.2. Contagem Celular

Os corpos de prova foram acondicionados em tubos plásticos estéreis contendo 1 mL de PBS estéril. Em seguida este conjunto foi levado ao sonicador por 30 segundos a 7 W. Após a dispersão celular do biofilme, o mesmo foi submetido à diluição decimal seriada. Três alíquotas de 20 uL foram inoculados em placas de Agar Sabouraud que foram incubadas por 48 horas a 35°C. Em seguida as colônias foram quantificadas e utilizadas para determinar o número de células presentes no biofilme.

3.9. Análise morfológica do biofilme

A análise morfológica do biofilme de *Candida albicans* foi avaliada por meio de microscopia de varredura 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. As imagens obtidas pela microscopia foram avaliadas no programa COMSTAT, que deu a interpretação matemática do biovolume, rugosidade de superfície e espessura máxima do biofilme avaliado.

4. RESULTADOS

Os valores médios e os desvios padrão para o fator em estudo de rugosidade de superfície e as variáveis respostas (contagem celular, bioatividade, bio-volume, espessura média, e rugosidade média) estão apresentados nas tabelas 5 e 6 para a resina de PMMA e nas tabelas 7 e 8 para o reembasador.

Tabela 5 – Rugosidade de superfície, contagem celular ($\times 10^6$ cel/mm²) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA adesão e 48 horas (média \pm d.p; n=12).

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

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

De acordo com os dados da tabela 5 pode ser observado que as diferentes rugosidades de superfície não influenciaram a contagem celular ou a bioatividade para ambos os tempos avaliados ($p>0,05$). Diferenças significantes foram observadas apenas entre os tempos de formação do biofilme: adesão ou 48 h o que era esperado, pois à medida que a colonização ocorre o número de células aumenta ($p<0,001$).

Tabela 6 - Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura (μm) e rugosidade (μm) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA nos tempos avaliados (média \pm d.p; n=5).

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

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

Na tabela 6 também foi observado diferenças significantes ($p < 0,001$) entre os tempos de formação do biofilme para as variáveis bio-volume, espessura e rugosidade.

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

Tabela 7 - Contagem celular ($\times 10^6$ cel/ mm^2) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador nos períodos avaliados (média \pm d.p; n=12).

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

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

Tabela 8 - Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura média (μm) e rugosidade de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador (média \pm d.p; n=5).

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

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

Na análise das tabelas 7 e 8 observa-se que a rugosidade de superfície do reembasador não interferiu no número de células, na bioatividade, no bio-volume e na espessura do biofilme de *Candida albicans* ATCC 90028 ($p < 0,05$). As diferenças observadas foram apenas para os tempos avaliados ($p < 0,001$).

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

As tabelas de 9 a 14 apresentam as médias e desvios-padrão, assim como os resultados da análise estatística para a energia livre de superfície.

Tabela 9. Energia livre de superfície do PMMA (componente polar, componentes polar positivo e negativo, componente dispersivo e energia livre total) conforme os tratamentos (média± desvio padrão; n=12).

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

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

De acordo com o apresentado na tabela 9, os tratamentos de superfície da resina de PMMA, não apresentaram diferenças significantes para a energia livre total que é a de interesse no estudo ($p > 0,05$).

Na tabela 10 estão apresentados a contagem celular e a bioatividade do biofilme de *Candida* formado sobre a resina de PMMA. Observam-se diferenças entre os tempos de adesão e 48 h para todos os tratamentos ($p < 0,001$). Entretanto dentro do mesmo período, adesão ou 48 horas foram observadas diferenças significantes para o tratamento com saliva na contagem celular onde foi encontrado o menor número de células aderidas.

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

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

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

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

Na tabela 11, para a resina de PMMA, o bio-volume, a espessura e rugosidade do biofilme foram influenciados pelos tratamentos de superfície. Observou-se que o bio-volume apresentou maior valor para o tratamento com saliva+plasma, seguido pela saliva e plasma na fase de adesão. Entretanto, para o biofilme maduro de 48 h o maior bio-volume foi observado para o plasma e o menor para a saliva.

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

atenção que o biofilme crescido na presença de saliva/plasma apresentou-se liso na fase de adesão e, rugoso quando formado na presença apenas de saliva.

Tabela 11. Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura (μm) e rugosidade (μm) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de PMMA de acordo com os tratamentos e tempos (média \pm d.p; n=5).

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

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

Na tabela 12 estão apresentados os valores médios e desvios-padrão da energia livre de superfície do reembasador após tratamentos com saliva, plasma ou saliva/plasma. Destaca-se que o tratamento de superfície com plasma diferiu significativamente dos outros dois tratamentos, mostrando menor energia livre de superfície ($p < 0,001$).

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

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

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

A tabela 13 apresenta os valores médios e desvios-padrão da contagem celular e bioatividade de *Candida albicans* ATCC 90028 na fase de adesão e após 48 h de formação do biofilme sobre as películas de saliva, plasma ou saliva/plasma formadas sobre o reembasador. Observam-se diferenças significantes na contagem celular para a fase de adesão quando a película de saliva apresentou a menor contagem celular comparado às outras duas películas. Entretanto, para o biofilme de 48 h, a maior contagem foi observada para a película de saliva/plasma, diferindo das outras duas películas ($p < 0,001$). A variável resposta bioatividade não foi afetada pelas películas.

Tabela 13. Contagem celular (10^6 cel/mm²) e bioatividade (D.O. de XTT) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador de acordo com os tratamentos e tempos (média±d.p; n=12).

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

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

Os dados de bio-volume, espessura e rugosidade do biofilme de *Candida albicans* ATCC 90028 estão apresentados na tabela 14. De acordo com esses resultados verifica-se que o bio-volume e a espessura foram influenciados pelas películas formadas sobre o reembasador, mostrando diferenças significantes entre as três películas tanto para adesão quanto para o biofilme de 48 h. Entretanto para a rugosidade de superfície apenas na fase de adesão as películas influenciaram ($p < 0,001$), sendo que a maior rugosidade foi observada para a película de saliva, sendo quase três vezes maior do que a do biofilme formado sobre saliva/plasma.

Tabela 14. Bio-volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espessura (μm) e rugosidade (μm) de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre a superfície de reembasador de acordo com os tratamentos e tempos (média \pm d.p; n=5).

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

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

As figuras 4 e 5 mostram imagens tridimensionais obtidas no CLSM representativa de biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028 no período de adesão e 48 h para resina PMMA e reembasador, respectivamente. As células vivas são mostradas em verde e as células mortas em vermelho. Na fase inicial de adesão é observado menor número de células com grande espaçamento entre as mesmas. No biofilme de 48 h observa-se um biofilme desenvolvido com várias camadas celulares e a presença de canais de difusão.

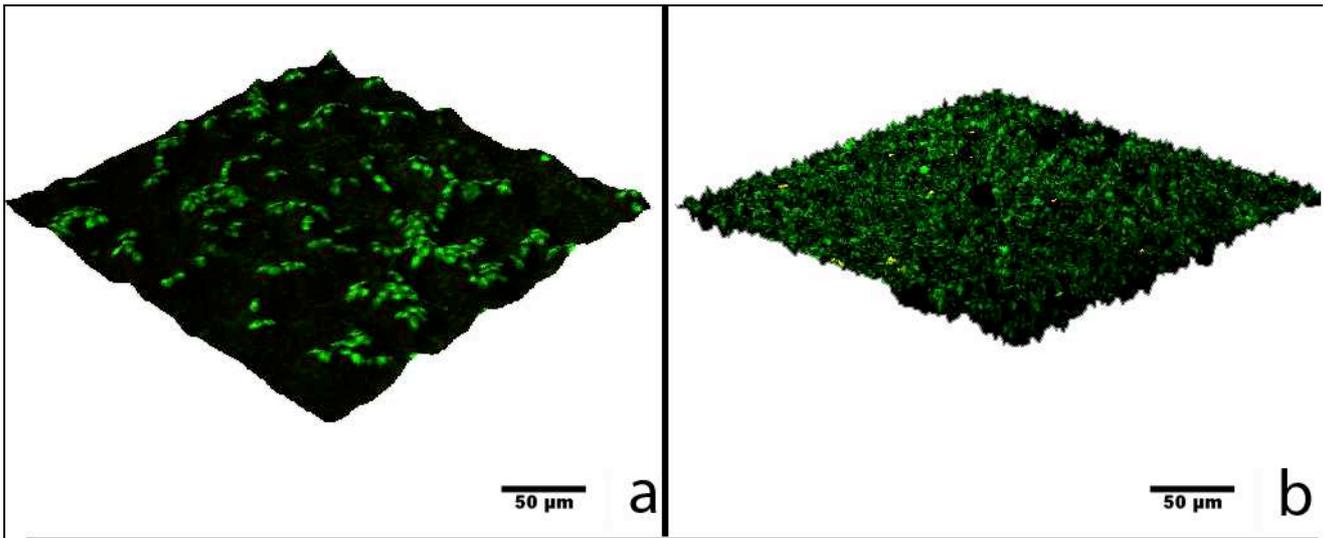


Figura 1 – CLSM imagem em 3D representativa de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028

(a - adesão; b – 48 horas) desenvolvidos sobre a superfície de resina a base de PMMA.

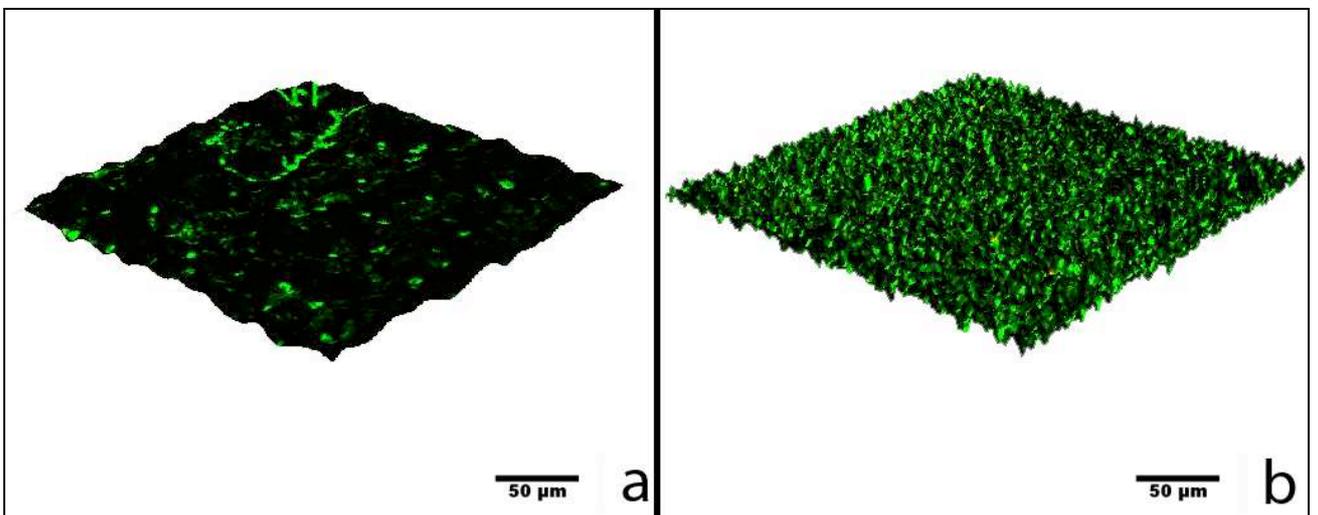


Figura 2 – CLSM imagem em 3D representativa de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028

(a - adesão; b – 48 horas) desenvolvidos sobre a superfície do material reembaasador.

5. Discussão

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

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

Para a maioria dos autores, as superfícies com maior rugosidade apresentam tendência a aumentar a aderência de *Candida* (Yamauchi *et al.*, 1990; Radford *et al.*, 1998; Neyzatoglu *et al.*, 2007; Pereira-Cenci *et al.*, 2007). No entanto, as alterações de rugosidade de superfície avaliadas neste estudo (0,30 μm , 0,17 μm , 0,12 μm e 0,11 μm) não provocaram diferenças significativas na contagem celular, no período de adesão, do biofilme formado sobre as superfícies dos espécimes de PMMA, conforme tabela 1. Isto provavelmente se justifica pela pequena variação de rugosidade entre os grupos, apesar de haver diferenças estatisticamente

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

O bio-volume representa o volume total do biofilme e também proporciona uma estimativa de sua biomassa podendo ser definido como o volume da biomassa dividido pela área do substrato. A espessura do biofilme fornece uma medida do tamanho espacial do biofilme. A espessura média pode proporcionar informação sobre a extensão superior do biofilme. A rugosidade do biofilme representa a medida de quanto varia a espessura do biofilme e é um indicador da heterogeneidade (Da Silva *et al.*, 2010).

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

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

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

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

Estudos demonstram que a energia livre de superfície tem um importante papel nas fases iniciais de adesão da *Candida albicans* sendo que os substratos com níveis elevados de energia livre de superfície induzem a uma maior adesão (Minagi *et al.*, 1985). Neste estudo, a energia livre de superfície foi mensurada após a imersão dos espécimes em saliva, plasma e 95% de saliva + 5% plasma durante 90 min para formação da película adquirida. Assim, conforme tabela 5, os tratamentos de superfície de resina PMMA, não apresentaram diferença significativa na energia livre total.

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

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

Nikawa *et al.* (2000) após usarem películas de saliva, plasma e saliva+plasma sobre resina acrílica e incubar com *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* concluíram que quanto maior a concentração de plasma na película maior a bioatividade do biofilme de *Candida*. Neste estudo não houve diferença significativa na contagem celular e bioatividade para o tratamento de plasma/saliva e plasma, nos períodos de adesão e 48 horas (tabela 6), ficando os maiores valores para o tratamento com saliva/plasma. Isto pode ter ocorrido em virtude deste estudo ter utilizado o teste de redução de XTT para mensuração da bioatividade enquanto o estudo de Nikawa utilizou o ensaio de bioluminescência da adenosina trifosfato (ATP).

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

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

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e considerando as limitações deste trabalho, é possível concluir que a rugosidade da superfície e a energia livre são capazes de modificar a estrutura do biofilme de *Candida albicans*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ten Cate, J.M., et al., *Molecular and cellular mechanisms that lead to Candida biofilm formation*. J Dent Res, 2009. **88**(2): p. 105-15.
2. Samaranayake, L.P., *Nutritional factors and oral candidosis*. J Oral Pathol, 1986. **15**(2): p. 61-5.
3. Tylenda, C.A., et al., *High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection*. J Oral Pathol Med, 1989. **18**(9): p. 520-4.
4. Soysa, N.S., L.P. Samaranayake, and A.N. Ellepola, *Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis*. Diabet Med, 2006. **23**(5): p. 455-9.
5. Wilkieson, C., et al., *Oral candidosis in the elderly in long term hospital care*. J Oral Pathol Med, 1991. **20**(1): p. 13-6.
6. Espinoza, I., et al., *Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile*. J Oral Pathol Med, 2003. **32**(10): p. 571-5.
7. Radford, D.R., S.J. Challacombe, and J.D. Walter, *Denture plaque and adherence of Candida albicans to denture-base materials in vivo and in vitro*. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**(1): p. 99-116.
8. Pires, F.R., et al., *Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients*. J Oral Rehabil, 2002. **29**(11): p. 1115-9.
9. Sipahi, C., N. Anil, and E. Bayramli, *The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials*. J Dent, 2001. **29**(3): p. 197-204.
10. Moura, J.S., et al., *Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four Candida species*. J Prosthet Dent, 2006. **96**(3): p. 205-11.
11. Minagi, S., et al., *Hydrophobic interaction in Candida albicans and Candida tropicalis adherence to various denture base resin materials*. Infect Immun, 1985. **47**(1): p. 11-4.
12. Serrano-Granger, C., et al., *In vitro study of the adherence of Candida albicans to acrylic resins: relationship to surface energy*. Int J Prosthodont, 2005. **18**(5): p. 392-8.

13. Pereira-Cenci, T., et al., *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): p. 308-10.
14. Radford, D.R., et al., *Adherence of Candida albicans to denture-base materials with different surface finishes*. J Dent, 1998. **26**(7): p. 577-83.
15. Nevzatoglu, E.U., et al., *Adherence of Candida albicans to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes*. Clin Oral Investig, 2007. **11**(3): p. 231-6.
16. Whitehead, K.A., J. Colligon, and J. Verran, *Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2005. **41**(2-3): p. 129-38.
17. Bollen, C.M., P. Lambrechts, and M. Quirynen, *Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature*. Dent Mater, 1997. **13**(4): p. 258-69.
18. Tsang, C.S., H. Ng, and A.S. McMillan, *Antifungal susceptibility of Candida albicans biofilms on titanium discs with different surface roughness*. Clin Oral Investig, 2007. **11**(4): p. 361-8.
19. da Silva, W.J., et al., *Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly(methyl methacrylate) resin surface*. Braz Dent J, 2008. **19**(3): p. 190-6.
20. Verran, J. and C.J. Maryan, *Retention of Candida albicans on acrylic resin and silicone of different surface topography*. J Prosthet Dent, 1997. **77**(5): p. 535-9.
21. Elguezabal, N., J.L. Maza, and J. Ponton, *Inhibition of adherence of Candida albicans and Candida dubliniensis to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies*. Oral Dis, 2004. **10**(2): p. 81-6.
22. Ferreira, M.A., et al., *Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with Candida species*. Clin Oral Investig, 2009. **13**(2): p. 237-42.
23. NCCLS, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Second Edition*. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). 2002.
24. NCCLS, *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline*. NCCLS document M44-A (ISBN 1-56238-532-1), 2004.

Anexo I

Consulta de despachos da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo, referente à iniciação científica concedida à acadêmica autora deste trabalho.



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2010/02091-5
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Encerrado
Vigência	01/06/2010 a 31/05/2011
Beneficiário	Flávia Carvalho Viu
Responsável	Wander José da Silva
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em / por: 16/02/2012 JOEL PEREIRA GUIMARAES

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	20/09/2011	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Beneficiário

Comunicamos que seu Relatório Científico foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

Atenciosamente,

Prof. Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico da FAPESP

OBSERVAÇÕES:

Obs.1: "A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador (a), sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o estudante candidato, o qual receberá uma cópia desta mensagem (sem transcrição do parecer)".

Frases para o Beneficiário

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Beneficiário

Não há transcrição associada.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	15/09/2011
Período Relacionado	10/11/2010 a 31/05/2011
Situação	Atendido