



**UNESP – Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**FERNANDA EMIKO IZUMIDA**

**EFETIVIDADE DE VERNIZES FOTOPOLIMERIZÁVEIS  
EXPERIMENTAIS NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE  
BIOFILME MULTIESPÉCIES E SUA ASSOCIAÇÃO COM A  
ESCOVAÇÃO NA REMOÇÃO E RECOLONIZAÇÃO DO  
BIOFILME EM UMA RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE  
PRÓTESE**



**Araraquara**

**2013**



**UNESP – Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**FERNANDA EMIKO IZUMIDA**

**EFETIVIDADE DE VERNIZES FOTOPOLIMERIZÁVEIS  
EXPERIMENTAIS NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME  
MULTIESPÉCIES E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ESCOVAÇÃO NA  
REMOÇÃO E RECOLONIZAÇÃO DO BIOFILME EM UMA RESINA  
ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da  
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da  
Universidade Estadual Paulista para obtenção do  
título de Doutor em Reabilitação Oral.**

**Orientador: Profa. Dra. Eunice Teresinha  
Giampaolo**

**Araraquara**

**2013**

Izumida, Fernanda Emiko

Efetividade de vernizes fotopolimerizáveis experimentais na adesão e formação de biofilme multiespécies e sua associação com a escovação na remoção e recolonização do biofilme em uma resina acrílica para base de prótese / Fernanda Emiko Izumida.-- Araraquara: [s.n.], 2013. 194 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

1. Resinas acrílicas 2. Saliva 3. Biofilmes 4. Candida albicans 5.  
Candida glabrata 6. Streptococcus mutans I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

FERNANDA EMIKO IZUMIDA

EFETIVIDADE DE VERNIZES FOTOPOLIMERIZÁVEIS  
EXPERIMENTAIS NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME  
MULTIESPÉCIES E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ESCOVAÇÃO  
NA REMOÇÃO E RECOLONIZAÇÃO DO BIOFILME EM UMA  
RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e orientador: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

2º examinador: Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro

3º examinador: Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá

4º examinador: Profa. Dra. Janaína Habib Jorge

5º examinador: Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho

Araraquara, 17 de julho de 2013.

## **DADOS CURRICULARES**

*Fernanda Emiko Izumida*

<b>NASCIMENTO</b>	22/09/1983 – São Paulo/SP
<b>FILIAÇÃO</b>	Hiroshi Izumida Virginia Clementina Izumida
<b>2002 – 2005</b>	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP
<b>2007-2009</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP
<b>2009-2013</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP

## *Dedicatória*

### *A DEUS*

Por me fornecer, acima de tudo, a vida, por estar sempre comigo, mesmo nos momentos em que eu teimo em duvidar...

Por me dar alento e consolo nos momentos de desespero e por me trazer tantos momentos felizes...

Por me permitir ter uma família maravilhosa e me rodear de pessoas boas...

Por permitir que eu acorde todos os dias e por me dar todas as oportunidades que me fazem seguir sempre em frente para me tornar um ser humano melhor.

Tudo, Senhor, é sua obra e tudo o que sou e o que consegui é graças a sua vontade!

“É bom agradecer ao Senhor, e tocar para o teu nome, ó Altíssimo,  
anunciar pela manhã o teu amor e tua fidelidade pela noite...  
Tu me dás o vigor de um touro e me unges com óleo novo.”

*Salmo 92*

## *Aos meus pais*

*Virginia e Hiroshi*

Por me amarem incondicionalmente, por me apoiarem em todos os momentos, por abdicarem dos seus sonhos em função dos meus...

Por serem meus exemplos de casal, de companheirismo, respeito e amor entre si e com a nossa família...

Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, tudo que sou devo a vocês e todas as minhas realizações são pra vocês!

Esta conquista é para e por vocês!!!

**Eu os amo demais!!!**

“Vós, filhos, sede obedientes a vossos pais no Senhor, porque isto é justo”

*(Efésios 6:1)*

“Honra a teu pai e a tua mãe, que é o primeiro mandamento com promessa, para que te vá bem, e vivas muito tempo sobre a terra”

*(Efésios 6:2-3)*

## *Ao meu esposo*

*Denilson*

Por ser o amor da minha vida, meu fiel companheiro, meu melhor amigo, meu mais profundo incentivador...

Por partilhar de um objetivo de vida comum, ainda que nossos sonhos não sejam exatamente os mesmos...

Por respeitar minha individualidade, minhas escolhas e decisões...

Por entender as horas em que ficava distante, seja por causa dos experimentos no laboratório ou pelos momentos dedicados ao computador...

Por me ajudar em várias etapas deste trabalho, mesmo sem entender direito qual seria a aplicação...

Por me acompanhar nos diversos congressos ao longo destes anos...

Enfim, por estar sempre comigo e me fazer ter muito orgulho desta nova família que estamos construindo!

**Te amo muito!**

“Amor não é se envolver com a "pessoa perfeita", aquela dos nossos sonhos. Não existem príncipes nem princesas. Encare a outra pessoa de forma sincera e real, exaltando suas qualidades, mas sabendo também de seus defeitos. O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser.”

*Mário Quintana*

## *Aos meus irmãos de sangue*

*Alessander, Fabiane e Flavia*

Os primeiros amigos da minha vida, os que me conhecem mais profundamente...

Os que me amam pelo que sou, com meus defeitos e qualidades...

Os que partilham da mesma educação e da mesma união familiar...

Os que me ensinam que ser irmão é muito mais que dividir a atenção do pai e da mãe, que é ser companheiro, mesmo a distância, que é querer sempre o melhor para o outro, que é se doar sem exigir nada em troca e que me mostram que o laço que nos une é mais forte que nossas diferenças de opinião...

Agradeço todos os dias aos nossos pais por me permitirem ter irmãos, porque a vida seria vazia sem vocês!!!

“Eu agora sei bem que os melhores brinquedos são os irmãos. Brinquedos vivos, que dão e recebem, que nos fazem crescer e crescem também pelas nossas mãos. Que se transformam depois em grandes amigos para toda a vida, em companhia sempre presente de uma maneira ou de outra, em refúgio e estímulo. Em algo que fica quando se perde tudo aquilo a que nos conduziu a nossa loucura, quando se perde o que o tempo nos vai levando.”

*Paulo Geraldo*

## *A minha sobrinha*

*Maria Antonia*

Meu pinguinho de luz, pedaço do céu na Terra... Tão pequena ainda, mas com uma importância tão grande na minha vida!

Você torna meus dias mais alegres, minha vida mais leve e mais tenaz!

Com você, Má, faço o treinamento do que é ser mãe, porque o laço que nos une é tão forte e o amor que nos cerca desde o seu nascimento só cresce a cada dia!

**Titia te ama muito!!**

“Só as crianças e os velhos conhecem a volúpia de viver dia-a-dia, hora a hora, e suas esperas e desejos nunca se estendem além de cinco minutos...”

*Mario Quintana*

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

*Charles Chaplin*

## *Aos meus irmãos de coração*

*Camilinha, Eduardo, Érica e Roberta*

Os irmãos de sangue são aqueles que nossos pais nos dão, que, com certeza, estarão sempre presentes em todos os momentos da nossa vida... Mas os irmãos de coração são aqueles que a vida põe em nossos caminhos e que a gente escolhe e ama como se fossem nossos irmãos de verdade... Cada um de vocês apareceu em um momento da minha vida, uns há mais tempo, outros mais recentemente, mas o amor, carinho, cumplicidade, respeito e admiração que nos cercam só me fazem agradecer por tê-los comigo! Não posso deixar de agradecer a cada um a imensa e fundamental ajuda para a realização deste trabalho. Esta tese, com certeza, é um pouco de vocês também!!!

Cá, você é muito mais que uma colega de Pós-Graduação, uma amiga da faculdade ou parceira de laboratório. Nossa amizade foi construída dia a dia e desejo sempre o melhor para você: sucesso, realização profissional, mas acima de tudo, que você seja extremamente feliz!!! Te admiro muito!!! Você é uma amiga muito especial!!!!

Du, você é o mais precioso presente que a Pós-Graduação me trouxe! Tenha certeza que esta etapa da minha vida só está se completando porque você esteve sempre ao meu lado, sendo meu cúmplice, amigo, colaborador essencial. Foi para você que partilhei todas as angústias, desesperos, dúvidas e frustrações sobre todos os aspectos da minha vida nestes anos. Você foi minha base forte na FOAr e muitas vezes a única razão de eu ir à faculdade! Obrigada por me entender, por me dar seu ombro amigo, por me dizer as verdades que precisava ouvir e por me permitir participar da sua vida também! Te adoro e admiro muito!!!!

Erikita, nosso encontro foi de almas irmãs! Nos identificamos de imediato, partilhamos tantos momentos de cumplicidade, amizade fraterna, companheirismo. Dividimos muito mais que almoços, refrigerantes ou cafezinhos no meio da manhã, dividimos nossas experiências de vida, nossos momentos de felicidade e fraqueza, nossa raiva e revolta de situações adversas. Você é muito mais que a técnica fundamental do laboratório de microbiologia, você é uma verdadeira “mana” para mim! Desejo imensamente continuar participando da sua vida!

Rô, estes 9 anos de convivência nos fizeram conhecer uma a outra pelo olhar, pela voz ao telefone e até mesmo pelo silêncio. Obrigada por aturar meus momentos de estresse, depressão e minhas inconstâncias de humor, e, principalmente por não desistir da nossa amizade!!

“Amigo é antes de tudo "certeza", seu modo de agir é seguro e sua esperança tranquiliza. Ele não apenas traz segurança. Ele é um pouco do que somos e, por isso mesmo, nos assegura que nunca estamos sem apoio.

Amigo não concorda em tudo, eles dizem verdades que doem mas também dizem verdades que curam! Corre risco de perder uma amizade, mas não deixa de sempre dizer a VERDADE!

As mais bonitas sementes de uma amizade são plantadas em um coração puro onde horizontes não possuem barreiras e o infinito e apenas o começo!

Muitos dizem que quem encontrou um amigo encontrou um tesouro, muitos dizem que amizade verdadeira dura para sempre, as amizades nascem do acaso ou de alguma força que faz de uma simples brincadeira unir duas pessoas, e a cumplicidade vai ganhando corpo e o desejo de estar junto vai aumentando e com ele a sensação sempre boa do poder partilhar e de doar!

A muitos se diz que o amigo verdadeiro se faz presente nos momentos mais difíceis da vida, naqueles momentos em que a dor parece querer superar o desejo de viver, amizade maior é aquela que o amigo seja capaz de estar ao lado do outro no momento de glória!”

*Gabriel Chalita*

“...Os amigos são para toda a vida, ainda que não estejam conosco a vida inteira. [...] Amizade não é dependência, submissão. Não se tem amigos para concordar na íntegra, mas para revisar os rascunhos e duvidar da letra. É independência, é respeito [...] O que é mais importante: a proximidade física ou afetiva?[...]Assim como há os amigos imaginários da infância, há os amigos invisíveis da maturidade. Aqueles que não estão perto podem estar dentro. [...] Amigo é o que fica depois da ressaca. É glicose no sangue. A serenidade.”

*Fabício Carpinejar*

## “FILHOS BRILHANTES ALUNOS FASCINANTES

Bons filhos conhecem o prefácio da história de seus pais. Filhos brilhantes vão muito mais longe, conhecem os capítulos mais importantes das suas vidas.

Bons jovens se preparam para o sucesso. Jovens brilhantes se preparam para as derrotas. Eles sabem que a vida é um contrato de risco e que não há caminhos sem acidentes.

Bons jovens tem sonhos ou disciplina. Jovens brilhantes tem sonhos e disciplina. Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas, que nunca transformam seus sonhos em realidade, e disciplina sem sonhos produz servos, pessoas que executam ordens, que fazem tudo automaticamente e sem pensar.

Bons alunos escondem certas intenções, mas alunos fascinantes são transparentes. Eles sabem que quem não é fiel à sua consciência tem uma dívida impagável consigo mesmo. Não querem, como alguns políticos, o sucesso a qualquer preço. Só querem o sucesso conquistado com suor, inteligência e transparência. Pois sabem que é melhor a verdade que dói do que a mentira que produz falso alívio. A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe mas no quanto ele tem consciência que não sabe.

O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz escolhas, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos.

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

Uma pessoa inteligente aprende com os seus erros, uma pessoa sábia vai além, aprende com os erros dos outros, pois é uma grande observadora.

Procurem um grande amor na vida e cultivem-no. Pois, sem amor, a vida se torna um rio sem nascente, um mar sem ondas, uma história sem aventura! Mas, nunca esqueçam, em primeiro lugar tenham um caso de amor consigo mesmos.”

*Augusto Cury*

## *Agradecimento especial*

### *À minha orientadora*

*Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo*

Exemplo de mestre, educadora, pesquisadora, enfim, uma docente completa! Muito obrigada pelo incentivo, conhecimento, respeito, dedicação e, principalmente, paciência e compreensão, despendidos durante todos estes anos de convivência. Mais que uma orientadora, a senhora é uma grande amiga a quem pude partilhar as experiências não só do ambiente de trabalho, mas também da vida pessoal. Te admiro pelo profissionalismo impecável, logicamente, mas também pela filha, tia, cunhada, irmã que a senhora é! Descobri que temos histórias de vida semelhantes em alguns aspectos e partilhamos do mesmo valor e atenção à família, o que torna nosso laço ainda mais forte!

“Aos velhos e jovens professores, aos mestres de todos os tempos que foram agraciados pelos céus por essa missão tão digna e feliz. Ser professor é um privilégio. Ser professor é semear em terreno sempre fértil e se encantar com a colheita. Ser professor é ser condutor de almas e de sonhos, é lapidar diamantes.”

*Gabriel Chalita*

## *Agradecimentos especiais*

Aos meus cunhados, **Diego, Edson e Tiago**, que me proporcionam momentos de descontração e divertimento e sempre torcem por minhas conquistas!

Aos meus familiares que me incentivam mesmo sem perceber, que me proporcionam momentos de convivência agradáveis e que acreditam em minha capacidade. Um agradecimento especial a minha querida e estimada **tia Teresa**, que hoje torce de algum outro ambiente não-terreno.

Aos meus sogros, **Rosalena e Laerte**, pelo acolhimento e pelo convívio cordial e constante.

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Ana Cláudia, Ana Lúcia, Carlos Vergani, Ewerton e Janaína**, pelos conhecimentos transmitidos, pela colaboração na elaboração desta pesquisa, pelos momentos agradáveis durante estes anos e pela troca de experiências nas reuniões do laboratório de microbiologia.

À amiga **Bia**, que além de colega de pós-graduação e de orientadora, é uma excelente companheira que me ajudou muito na realização da parte microbiológica deste trabalho. Obrigada por ser sempre solícita quando te pedia ajuda e por muitas vezes deixar de lado suas atividades para me socorrer! Tenho certeza que brevemente você começará a colher os frutos do Mestrado e que fará um excelente Doutorado! Conte sempre comigo!

Aos amigos e colegas do Curso de Reabilitação Oral, **Amanda, Analu, Ana Paula, André, Antônio, Camila Foggi, Camilo, Carol, Cadu, Chai, Cris, Fer Alves, Flávia, Ju Cabrini, Ju Delben, Paty e Rodrigo**, por compartilharem dos momentos de aflição, dos seminários que pareciam intermináveis, das inúmeras horas no laboratório de micro, das ajudas mútuas, dos momentos de descontração e confraternização...

Às técnicas da Prótese Removível, **Raíssa e Paula**, pela ajuda no laboratório de micro e nas explicações sobre os procedimentos experimentais, além da convivência sempre muito agradável e prazerosa.

Ao meu grande amigo e “pai” odontológico **Luiz Antônio Borelli Barros**, pelo incentivo, pelas ajudas mais variadas, pelo exemplo de esposo, pai e profissional!

Ao químico responsável pela confecção dos vernizes experimentais **Jörg Exrleben**, pela incomensurável ajuda e orientação durante todas as etapas deste trabalho, pela acolhida nas visitas a Pirassununga e, principalmente pela amizade e paciência em todos os momentos!

Ao prof. Dr. **Romeu Magnani**, pela inestimável ajuda na realização da análise estatística deste trabalho, pela paciência nos nossos encontros e por sempre me socorrer na descrição dos resultados!

Ao prof. Dr. **Peter Hammer**, pesquisador nível III do Instituto de Química da UNESP, pela realização das análises de XPS e pelo auxílio na interpretação das mesmas.

Ao prof. **Pedro Nescente**, professor associado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAr), pelas explicações e socorros sobre a análise por XPS e por sua tentativa em realizar as análises, embora seu aparelho tenha avariado por um período tão grande de tempo. Meus sinceros agradecimentos!

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e orientação.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, na pessoa da diretora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Andréia Affonso Barretto Montandon e da vice-diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, **Martinha, Malu, Adelaide, Adelaidinha, Miriam e Dulce**, pelo convívio sempre agradável, pela compreensão e solicitude constantes.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, em especial à **Mara** e ao **Alexandre**, pela paciência, pelos inúmeros socorros, pelas informações prestadas e principalmente pelo carinho despendido durante estes 6 anos de convivência.

Aos funcionários da Biblioteca, pelos serviços prestados para a finalização deste trabalho.

Ao **Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de Doutorado fornecida nos primeiros meses de ingresso no Curso de Doutorado;

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de Doutorado (2010/00545-9) e Auxílio a Pesquisa (2012/01528-6) concedidos para a realização deste trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos!



*Resumo*

Izumida FE. Efetividade de vernizes fotopolimerizáveis experimentais na adesão e formação de biofilme multiespécies e sua associação com a escovação na remoção e recolonização do biofilme em uma resina acrílica para base de prótese [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

### **Resumo**

Este estudo avaliou dois vernizes experimentais (M e P) em três diferentes concentrações (25, 30 e 35%) na prevenção da adesão e formação de biofilme multiespécies (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*) e sua associação com a escovação na remoção do biofilme e sua recolonização. Corpos-de-prova lisos e rugosos de uma resina acrílica foram confeccionados e divididos em grupos experimentais, de acordo com o verniz e concentração, além de grupos controle (sem verniz). Metade das amostras foi exposta em saliva (30 minutos). Posteriormente, realizou-se a adesão (90 minutos) ou a formação do biofilme multiespécies (48 horas). Para a avaliação da capacidade de remoção do biofilme aderido, corpos-de-prova contaminados foram escovados (30 segundos) e para a recolonização, além da escovação, as amostras foram incubadas por período adicional de 48 horas. Os micro-organismos remanescentes foram mensurados pelos ensaios de XTT e UFC. Para os testes de adesão e formação do biofilme, os grupos experimentais apresentaram, em geral, menor absorvância comparados com o controle, porém esta diferença não foi significativa para a contagem de colônias, exceto para o *S. mutans* na formação do biofilme. A rugosidade, em geral, não promoveu alteração em qualquer dos testes realizados. A saliva não promoveu alterações na adesão dos micro-organismos, mas alterou a quantidade de biofilme formado. Houve remoção efetiva do biofilme com a escovação e com a recolonização. Conclui-se que os vernizes fotopolimerizáveis experimentais reduziram discretamente a adesão e formação do biofilme. Além disso, a escovação foi efetiva na remoção e recolonização do biofilme multiespécies.

Palavras – Chave: resinas acrílicas, saliva, biofilmes, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Streptococcus mutans*.



# *Abstract*

Izumida FE. Effectiveness of experimental coatings in adhesion and biofilm formation of multi-species biofilm and its association with brushing on biofilm removal and their recolonization in an denture base acrylic resin [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

### **Abstract**

This study evaluated the ability of two experimental coatings (M and P) at 25, 30 and 35% concentrations to modify the surface characteristics of a denture base resin and prevent the adhesion and biofilm formation of multi-species, as well as the effectiveness of brushing on biofilm removal and their recolonization. Specimens with smooth and rough surfaces were prepared and divided into experimental groups, according to the coating and concentration, and controls group (without coating). A half of specimens were exposed to saliva (30 minutes). The microorganisms adhesion (*Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Streptococcus mutans*) was performed for 90 minutes and the biofilm formation was performed for 48 hours. For effectiveness of toothbrushing in biofilm elimination test, contaminated specimens with biofilm were exposed to toothbrushing in a brushing machine (30 seconds) and for recolonization, after brushing, the specimens were incubated again for 48 hours. Microorganisms quantification was measured by XTT and UFC tests. The adhesion and biofilm development showed that the experimental groups were, in general, lower absorbance compared with the control, but this difference was not significant for colony counting, except for *S. mutans* in biofilm formation. The roughness, in general, did not cause any change in all tests performed. Saliva did not change the adhesion of microorganisms, but reduce the biofilm formation. There was effective biofilm removal with brushing and recolonization tests. It was concluded that the experimental photopolymerised coatings slightly reduced adhesion and biofilm formation. Furthermore, toothbrushing was effective in multi-species biofilm removal and their recolonization.

Key-Words: acrylic resins, saliva, biofilms, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Streptococcus mutans*.

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução .....</b>	<b>23</b>
<b>2 Revisão da literatura .....</b>	<b>30</b>
<b>3 Proposição .....</b>	<b>87</b>
<b>4 Material e Método.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>90</b>
<b>4.2 Método.....</b>	<b>96</b>
4.4.1 Confeção dos corpos-de-prova .....	96
4.4.2 Mensuração da rugosidade superficial.....	97
4.4.3 Aplicação dos vernizes experimentais.....	98
4.4.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X .....	100
4.4.5 Esterilização dos corpos-de-prova.....	101
4.4.6 Adesão e formação do biofilme multiespécies nos corpos-de-prova .....	101
4.4.7 Ensaio de escovação .....	103
4.4.8 Recolonização do biofilme multiespécies após a escovação .....	106
4.4.9 Mensuração do metabolismo celular e número de células viáveis .....	106
4.4.10 Metodologia estatística .....	109
<b>5 Resultado .....</b>	<b>114</b>
<b>6 Discussão.....</b>	<b>129</b>
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>142</b>
<b>8 Referências .....</b>	<b>144</b>
<b>Apêndice .....</b>	<b>159</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>192</b>



# *Introdução*

## 1 Introdução

Os micro-organismos do gênero *Candida* são as espécies mais comumente associadas ao desenvolvimento de uma infecção nos tecidos orais pelo uso contínuo de próteses removíveis, denominada estomatite protética<sup>94</sup>. Esta patologia acomete cerca de 65% dos portadores de próteses removíveis<sup>41, 79</sup> e é caracterizada clinicamente por diferentes graus de inflamação da mucosa palatal em contato com a superfície da prótese, variando desde petéquias a inflamação generalizada com hiperplasia papilar<sup>94</sup>. Os fatores que podem contribuir para a instalação dessa doença vão desde alterações sistêmicas<sup>126</sup> e higienização bucal deficiente<sup>133</sup> até características superficiais da resina acrílica de base de prótese, como a hidrofobicidade e a rugosidade superficial, os quais contribuem para a adesão de micro-organismos, etapa crucial na formação do biofilme<sup>11, 62, 69, 71, 91, 98</sup>. Tem sido relatado que superfícies moderadamente hidrofóbicas facilitam a aderência enquanto superfícies hidrofílicas e fortemente hidrofóbicas limitam a aderência celular<sup>73</sup>. No caso da rugosidade superficial, é clara a associação da colonização microbiana e o aumento da rugosidade, uma vez que superfícies rugosas apresentam uma maior área de superfície e atuam como nichos para os micro-organismos, favorecendo assim a aderência<sup>48, 68, 69, 84, 93, 94, 121, 122, 129, 136</sup>. Com base nestes aspectos, a prótese pode atuar como um reservatório de micro-organismos e colaborar para a manutenção de quadros infecciosos locais<sup>15, 140</sup> e sistêmicos.

A colonização das próteses por micro-organismos pode também ser influenciada pela película adquirida<sup>77, 79</sup>, a qual é uma camada acelular constituída por proteínas, glicoproteínas e lipídeos<sup>76</sup>. O condicionamento salivar sobre uma superfície se inicia segundos após a exposição ao ambiente bucal e no primeiro minuto, componentes salivares específicos são detectados, seguidos por adesão espaço-temporal de diferentes espécies e cepas bacterianas<sup>128</sup>. Estes colonizadores primários (em geral do gênero *Streptococcus* e *Actinomyces*) multiplicam-se sobre o substrato e formam micro-colônias<sup>106</sup>, seguido do aumento da diversidade microbiana, por bactérias mais patogênicas e espécies e cepas comensais, até atingir uma comunidade clímax<sup>88, 128</sup>. Dhir et al.<sup>31</sup> (2007), relataram que a película adquirida formada sobre a superfície de polimetilmetacrilato (PMMA) não apresenta alguns componentes encontrados na película adquirida do esmalte, tais como a histatina e estaterinas salivares. Segundo os autores, a ausência destas importantes moléculas de defesa nas superfícies protéticas pode ser atribuída à falta de carga iônica no PMMA, o que pode

ser responsável pela diminuição da função protetora da película adquirida na prótese, levando a uma maior adesão de micro-organismos. Este mesmo efeito na adesão inicial dos micro-organismos sobre a superfície acrílica também pode ser observada em outros estudos<sup>33, 79</sup>. Entretanto, a literatura não é unânime no papel da saliva durante a colonização inicial e consequente formação do biofilme, uma vez que vários estudos relataram que o pré-tratamento com saliva promoveu redução da adesão de micro-organismos<sup>84, 95, 109, 112, 129</sup>, enquanto outros autores não observaram qualquer efeito ou até mesmo o aumento da colonização microbiana<sup>13, 16, 54, 68, 123, 137</sup>.

O biofilme formado sobre a superfície das próteses é caracterizado por uma comunidade complexa de micro-organismos associados, envolta por uma matriz de polissacarídeos, o que favorece a proliferação e a sobrevivência dos mesmos<sup>9, 18, 21, 38, 47, 50, 66, 67, 83, 96, 100, 103</sup>. O biofilme apresenta vantagens aos micro-organismos se comparado com a colônia microbiana, uma vez que possibilita melhor comunicação entre as células em função da continuidade entre elas, o que facilita as atividades bioquímicas, maior proliferação e acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas. Ainda, o biofilme favorece a defesa coletiva contra a ação de remoção pela saliva e de agentes microbianos<sup>119</sup>.

O modelo de biofilme monoespécie não é organizado em comunidades tão complexas como ocorre nos biofilmes de multiespécies, que envolvem bactérias e fungos<sup>126</sup>. Estudos *in vitro* tem indicado a possibilidade de forte e complexa interação inter e intraespécies nas comunidades mistas, incluindo reações de comensalismo, antagonismo<sup>85, 124</sup> e mutualismo<sup>82, 134</sup>. Um bom exemplo de interação mutuamente benéfica é a co-agregação, um fenômeno que acontece em biofilme oral e aquático<sup>105</sup>. Isso ocorre quando duas ou mais cepas geneticamente distintas interagem por reconhecimento específico célula-célula<sup>56</sup>.

Tendo em vista que as próteses ficam em contato direto com a mucosa palatal e, conseqüentemente, com uma variedade de micro-organismos no qual podem habitar estas superfícies protéticas, é possível presumir que o biofilme formado sobre estas superfícies tenha a mesma complexidade e variedade microbiana que a mucosa subjacente<sup>7, 34</sup>. Assim, embora o gênero *Candida*, em especial a *C. albicans*, seja predominante e mais patogênico<sup>10, 30, 45</sup>, outras espécies como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* também podem ser encontradas nos biofilmes formados nas superfícies protéticas<sup>40, 131</sup>. Além disso, micro-organismos como o *Streptococcus mutans* e outras espécies bacterianas também constituem componentes importantes do

biofilme da prótese<sup>4, 29, 79, 103</sup>. Vários estudos demonstram a habilidade de crescimento de *C. albicans* e *S. mutans* isoladamente, mas poucos relatam a interação que pode ocorrer quando ambas as espécies colonizam simultaneamente o mesmo nicho<sup>9</sup>. Pereira-Cenci et al.<sup>96</sup> (2008) constataram que a presença de *S. mutans* em biofilme multiespécie contendo *C. albicans* e *C. glabrata* promoveu o crescimento das duas espécies de *Candida* nas condições experimentais, sugerindo que pode ter ocorrido estímulo para o crescimento mútuo de micro-organismos como também co-agregação, aumentando o processo de adesão. Dessa forma, os autores concluíram que a interação da *C. albicans* com outros micro-organismos pode determinar sua virulência. De Andrade et al.<sup>29</sup> (2012) relataram que o *S. mutans* facilitam a aderência de células de *C. albicans* sobre a base da prótese e mucosa, principalmente através da produção de matriz extracelular. Ainda, segundo os autores, as bactérias aumentam a acidez do meio, o que fornece condições para o crescimento fúngico.

O tratamento para a estomatite protética é tão complexo quanto à própria patologia<sup>31</sup>. Modalidades tradicionais de tratamento incluem a utilização de agentes antifúngicos, de aplicação tópica ou sistêmica, dependendo da severidade da infecção<sup>97</sup>. Gomes et al.<sup>40</sup> (2011), relataram que o fluconazol tem sido o agente antifúngico de escolha para o tratamento sistêmico e da mucosa infectada por *Candida sp.* Segundo os autores, a difusão na utilização deste fármaco pode ser atribuída a sua elevada biodisponibilidade, baixa hepatotoxicidade, custo reduzido e possibilidade de administração oral e intravenosa. Entretanto, o desenvolvimento de resistência aos componentes azóis tem sido observado em vários micro-organismos, em particular para a *C. albicans*, o que pode levar a formação de micro-organismos seletivos, além de favorecer o aparecimento de infecções de espécies por *Candida* não-albicans. Dentro deste contexto, a infecção por *C. glabrata*, a qual é naturalmente mais resistente aos agentes antifúngicos, está fortemente associada a infecções sistêmicas generalizadas com elevada taxa de mortalidade<sup>9</sup>. Além disso, estudos tem demonstrado que a reincidência de estomatite protética após a supressão do tratamento é bastante frequente (cerca de 50% dos casos)<sup>6, 31, 64, 62, 65</sup>, salvo os casos em que a superfície da prótese seja modificada com o objetivo de eliminar as hifas de *Candida*<sup>31</sup>. Dessa forma, o tratamento dessa patologia deveria incluir também a remoção ou inativação dos micro-organismos presentes nas próteses<sup>27, 111</sup>, com a finalidade de evitar a reinfecção da mucosa do paciente<sup>26, 27</sup>.

A remoção do biofilme das próteses através de métodos mecânicos, químicos ou a associação destes é largamente discutido na literatura<sup>24, 28, 29, 41, 90, 94, 118, 128</sup>. De acordo com Paranhos et al.<sup>90</sup> (2009), uma apropriada higiene das próteses é um importante fator para a manutenção de uma mucosa saudável, assim como a saúde em geral, especialmente em idosos. Tem sido relatado que a higienização das próteses com escova e creme dental é um dos métodos mecânicos mais utilizados<sup>95, 28, 29</sup>, uma vez que apresenta como vantagens a simplicidade, custo acessível e efetividade<sup>24, 29, 30, 55, 92, 94</sup>. Kulak et al.<sup>63</sup>, em 1997, relataram que, se realizada corretamente, a escovação remove a placa acumulada eficientemente. Embora a capacidade de remoção do biofilme seja comprovada, a ação abrasiva do dentífrício durante a escovação pode resultar em desgaste e aumento da rugosidade da superfície da resina, facilitando a adesão de micro-organismos<sup>28, 29, 55, 94</sup> e, conseqüentemente, a formação de biofilme. Dessa forma, a utilização de agentes de limpeza com menor ação abrasiva ou sem abrasivos poderia reduzir as desvantagens dos dentífrícios. Neste contexto, estudos recentes utilizaram o sabão de coco em substituição aos dentífrícios convencionais devido a sua menor ação abrasiva e de degradação do material<sup>5, 12, 46, 81</sup>.

Até o momento foram descritos métodos de controle do biofilme após a colonização das próteses. Entretanto, a interdisciplinaridade e a evolução conjunta da engenharia de materiais com a Odontologia tem concentrado esforços no desenvolvimento de novos materiais ou no aperfeiçoamento de materiais já existentes, principalmente no que se refere à redução da adesão de micro-organismos na superfície protética, o que traduziria em grande alternativa terapêutica na prevenção da estomatite protética.

Estudos tem correlacionado a adesão de micro-organismos às superfícies poliméricas com a ação de atração hidrofóbica, energia livre de superfície e forças de repulsão eletrostáticas ou potencial zeta<sup>8, 93</sup>.

Para as superfícies hidrofóbicas, como o PMMA, unidades monoméricas expostas na superfície interagem com domínios hidrofóbicos das proteínas por ligações hidrofóbicas fortes<sup>93</sup>, mais propriamente denominadas forças de atração London Van der Waals<sup>59</sup>. A cinética da interação entre polímeros e fungos demonstra cooperação negativa (como as leveduras estão unidas ao polímero ocorre uma força negativa simultânea)<sup>59</sup>. Dessa forma, as interações de atração hidrofóbicas podem resultar numa tendência para maior adesão dos micro-organismos a superfícies hidrofóbicas do que a superfícies hidrofílicas. A contribuição das interações

eletrostáticas entre os micro-organismos e as superfícies poliméricas é secundária às forças hidrofóbicas, porque o processo de aderência ocorre na presença de forças repulsivas<sup>93</sup>. As superfícies plásticas apresentam graus variáveis de carga superficial líquida negativa; similarmente, todas as células vivas (incluindo as leveduras e bactérias) apresentam carga superficial negativa. Assim, as interações de carga negativa-negativa, isto é, as interações que podem ocorrer entre os polímeros e leveduras e entre leveduras e leveduras podem ser esperadas para criar uma condição de ligação negativa cooperativa ou repulsão eletrostática<sup>59</sup>. Entretanto, outros fatores, tais como o tamanho ou forma do micro-organismo, exercem importante influência sobre a adesão das leveduras aos polímeros.

Além disso, polímeros com grupos iônicos de fortes dipolos tendem a ser hidrofílicos, resultando em aumento da energia livre de superfície das superfícies poliméricas. Pela compreensão do efeito das interações eletrostáticas na adesão da *C. albicans* ao PMMA, pode ser sugerido que materiais de base de prótese que sejam carregados positivamente podem prevenir a adesão de *C. albicans* e reduzir assim o desenvolvimento da estomatite protética<sup>93</sup>. A modificação química da carga superficial da resina de base de prótese traduz uma nova alternativa na prevenção da adesão de *C. albicans*<sup>93</sup>.

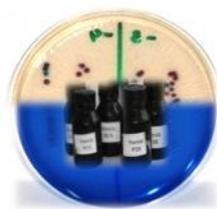
A adsorção de proteínas é um dos fenômenos mais importantes na determinação da biocompatibilidade dos materiais. Em geral, as proteínas se aderem a uma superfície após poucos minutos de contato do material com os fluidos corpóreos como o sangue, plasma, lágrimas ou saliva<sup>54</sup>. Para reduzir a adsorção proteica, alguns métodos tem sido descritos, tais como a construção de uma superfície hidrofílica ou pela modificação dos materiais com polímeros hidrofílicos<sup>54</sup>.

Polímeros hidrofílicos como a polivinilpirrolidona, policrilamida e polietilenoglicol (PEG), tem sido utilizados para modificar a superfície de materiais para reduzir a adsorção de proteínas e adesão bacteriana<sup>14, 23, 141</sup>. Estes polímeros promovem a formação de uma camada de hidratação originada de ligações de hidrogênio. Dessa forma, as moléculas de água aderidas ao material o tornam mais liso e hidrofílico, o que tende a reduzir a aderência de micro-organismos. Tem sido demonstrado que a adsorção de proteínas nas superfícies hidrofílicas é relativamente fraca comparada com as superfícies hidrofóbicas, nas quais a adsorção de proteínas tende a ser forte e praticamente irreversível<sup>3, 115</sup>. Assim, o aumento na hidrofilicidade no interior das superfícies das próteses pode reduzir a adesão de microrganismos.

Outros polímeros, denominados zwitteriônicos, como as fosfatidilcolinas e sulfobetainas, tem sido estudados por sua capacidade de resistir à adsorção de proteínas e adesão bacteriana. As características não agregatórias destes grupos tem sido atribuídas à formação de uma camada de hidratação fortemente ligada à superfície do material, induzida por solvatação eletrostaticamente iônica associada a ligações de hidrogênio, devido ao fato que estes polímeros apresentam carga tanto positiva quanto negativa, mas preservam a carga total neutra<sup>17, 20, 49, 53, 54, 68, 70, 86, 131</sup>. Dessa forma, os materiais zwitteriônicos podem se ligar mais fortemente a moléculas de água comparado com outros materiais hidrofílicos, devido às interações eletrostáticas entre seus dipolos e as moléculas de água<sup>49</sup>. Embora os materiais zwitteriônicos tenham sido primariamente utilizados para favorecer a hemocompatibilidade dos materiais<sup>17, 70, 86</sup>, estudos demonstraram que a aplicação da sulfobetaina na superfície de polimetilmetacrilato reduziu a adesão de microrganismos como a *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus*<sup>131, 20, 74</sup>. Estes resultados sugerem que a sulfobetaina pode modificar a superfície de próteses com o objetivo de prevenir a estomatite protética.

Em estudos recentes, Lazarin et al.<sup>68, 69</sup> (2012 e 2013) avaliaram a efetividade de quatro vernizes fotopolimerizáveis experimentais, três a base de monômeros hidrofílicos e um contendo monômeros zwitteriônicos em três concentrações na hidrofobicidade e na redução da adesão de *C. albicans* em uma resina acrílica. Além da avaliação do efeito da pré exposição em saliva nesta adesão. A quantificação celular foi realizada por meio da coloração de cristal violeta ou pelo ensaio de XTT. Os autores observaram que um verniz contendo monômero hidrofílico e aquele contendo o monômero zwitteriônico foram efetivos na redução da adesão de *C. albicans* e podem ser considerados para o tratamento preventivo da estomatite protética.

Com base nos aspectos apresentados, foi considerado oportuno realizar um estudo para avaliar a capacidade dois vernizes experimentais (metacrilato de sulfobetaina – M e 3-hidroxiopropil metacrilato - P) em três concentrações (25, 30 e 35%), que apresentam em sua formulação monômeros hidrofílicos ou zwitteriônicos, na prevenção da adesão e formação e remoção de biofilme multiespécies sobre uma resina para base de prótese. Adicionalmente, o efeito dos vernizes associados à escovação na remoção e recolonização do biofilme multiespécies também foi analisado.



# *Revisão da Literatura*

## 2 Revisão da Literatura

Klotz et al.<sup>59</sup> (1985) avaliaram a afinidade hidrofóbica das células fúngicas, por avaliação bifásica água-hidrocarbono, e medida de ângulo de contato dos micro-organismos e dos substratos (politetrafluorretileno –Teflon; Polietilireftalato - PET, polimetilmetacrilato - PMMA e poliestireno) com o objetivo de caracterizar a biofísica da aderência de *Candida* às superfícies poliméricas. Além disso, os autores verificaram o envolvimento das forças eletrostáticas no processo de aderência, por meio da alteração da carga de superfície fúngica por bloqueio seletivo dos grupos amino e carboxil. Os resultados obtidos demonstraram que a hidrofobicidade fúngica foi correlacionada com a tendência dos micro-organismos de se aderirem ao poliestireno, independente do método utilizado (medida do ângulo de contato e avaliação bifásica água-hidrocarbono), exceto para a *Candida krusei*, o que pode indicar que essa espécie possui um mecanismo adicional envolvido na aderência. Com relação à aderência fúngica aos polímeros, foi evidente que houve uma relação linear entre o número de células aderidas por unidade de área e o ângulo de contato do substrato, ou seja, quanto mais hidrofóbica a superfície, maior a aderência celular por unidade de área. Quando os autores avaliaram as alterações de cargas realizadas nas superfícies fúngicas, eles observaram que a carga positiva nos fungos ocasionou uma alteração do comportamento de aderência, tornando-os, consideravelmente, mais aderentes. Diante disso, os autores concluíram que as interações eletrostáticas repulsivas realmente existem, porque na ausência delas, a aderência é aumentada. Eles ainda puderam supor que essas interações eletrostáticas, embora presentes e capazes de influenciar a cinética de aderência são menores quando comparadas às forças atrativas de London-Van der Waals, ou hidrofóbicas, considerando que mesmo na presença delas (forças repulsivas) a adesão ocorre.

O objetivo do estudo de Kulak et al.<sup>63</sup> (1997) foi avaliar o efeito da escovação e imersão em soluções desinfetantes na contaminação das superfícies da prótese por placa, cálculo e microflora. Oito amostras de próteses totais superiores de cinco pacientes foram utilizadas para o ensaio. Uma das oito amostras foi deixada sem tratamento – controle - e as demais foram submetidas à imersão por período noturno em uma das seguintes soluções desinfetantes: Corega, Dentipur, Fittydent, Hipoclorito de sódio 5%, Savlon, Setrimid com clorexidina, Ipanol e escovação com creme dental e escova macia. A superfície da resina foi avaliada em microscópio eletrônico antes e

após os tratamentos. Houve diferença significativa entre os tratamentos. Comparado com o controle, todos os tratamentos reduziram a área coberta por materiais estranhos, sendo os melhores resultados encontrados para os materiais Savlon e Hipoclorito de sódio 5%.

No mesmo ano, Verran, Maryan<sup>127</sup> compararam a retenção de *Candida albicans* em superfícies lisas e rugosas de uma resina acrílica e de um silicone para próteses faciais, e determinaram o efeito da rugosidade superficial na infecção e higienização das próteses. Corpos-de-prova com superfícies lisas e rugosas de cada material foram confeccionados e suas rugosidades superficiais foram mensuradas em rugosímetro, sendo que a rugosidade dos corpos-de-prova de silicone foi mensurada indiretamente, através da medição na superfície do gesso sobre o qual o silicone foi confeccionado. Isto porque o silicone não pode ser diretamente mensurado devido a sua fácil distorção. A seguir, os corpos-de-prova foram limpos em ultrassom com álcool 90% por 1 minuto, lavados em água destilada e imersos em água estéril durante 24 horas a 24°C. A adesão de *Candida albicans* sobre a superfície das amostras foi realizada pela contaminação com suspensões padronizadas por 1 hora a 24°C. Decorrido este período, as amostras foram lavadas e os micro-organismos aderidos sobre as superfícies foram corados e contados. Não foram encontradas diferenças na quantidade de células de *C. albicans* entre os materiais de superfície lisa avaliados, os quais também apresentaram menores índices de adesão comparados com as amostras de superfície rugosa, sendo que o material a base de silicone promoveram maior adesão fúngica comparada com a resina acrílica. Os valores obtidos em Ra foram, respectivamente, de 0,02; 1,26 e 1,96  $\mu\text{m}$  para as superfícies de resina acrílica lisas, rugosas e prensadas sobre gesso com aplicação de isolante. Para as superfícies de gesso, sobre as quais o silicone foi polimerizado, foi observada uma rugosidade média maior ( $R_z - 12,8 \mu\text{m}$ ) que a da resina acrílica ( $R_z - 7,3 \mu\text{m}$ ). Os autores concluíram que o aumento na rugosidade superficial pode facilitar a retenção fúngica e a infecção das próteses.

Waters et al.<sup>129</sup>, ainda em 1997, avaliaram a adesão de *C. albicans* em dois materiais resilientes experimentais e compararam os resultados encontrados com materiais comercialmente disponíveis (Molloplast-B e a resina acrílica para base de prótese Trevalon). O material experimental nº 1 era de base elastomérica elastômero, contendo um polímero (dimetilpolisiloxano) e carga de sílica com a superfície tratada, enquanto o material experimental nº 2 possuía uma carga, com superfície tratada,

diferente da primeira que não causa uma alta absorção de água. Os corpos-de-prova foram obtidos a partir de matrizes metálicas altamente polidas (10 mm x 10 mm x 3 mm) com a finalidade de reproduzir e padronizar as superfícies das amostras, que foram preparadas de acordo com as instruções de cada fabricante e, em seguida, armazenadas em água estéril, por 24 horas, para saturação. Foram utilizadas três cepas de *C. albicans*: GRI 681 (com baixa aderência ao epitélio e superfícies inertes) e as cepas CDH 667 e 674, isoladas, respectivamente, de pacientes com estomatite protética e candidose hiperplásica crônica. As células dos micro-organismos foram quantificadas com hemocitômetro e padronizadas à concentração de  $10^7$  cel/ml. Saliva não estimulada coletada a partir de cinco voluntários, centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4°C e então filtrada foi utilizada para o pré-condicionamento dos corpos-de-prova, realizado em temperatura ambiente, por 30 minutos sob leve agitação. Em seguida, as amostras foram incubadas em 20 ml de suspensão fúngica, à temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, os corpos-de-prova foram cuidadosamente lavados duas vezes, em PBS, por um minuto. Após a secagem, as células aderidas foram fixadas em metanol e coradas. Para os materiais resilientes foi utilizado o corante cristal violeta por 30 segundos. Para a resina acrílica opaca foi utilizado o corante “acridine orange” (0,003% em 2,5% de ácido acético). Todos os materiais foram lavados em PBS por 30 segundos e examinados em microscópio de luz (cristal violeta) ou microscopia de fluorescência (“acridine orange”). O procedimento microbiológico foi realizado em triplicata e em duas ocasiões distintas. As médias e desvio padrão para todos os grupos experimentais foram calculadas, comparadas com o teste t, seguido da ANOVA e a correlação de Bonferroni. Houve uma menor aderência de *Candida* para os materiais experimentais comparada à resina Trevalon e Molloplast-B. As diferentes cepas exibiram variação de adesão estatisticamente significativa em todos os casos, exceto entre as cepas CDH 667 e CDH 674, aderidas ao material experimental nº 2 e ao Molloplast-B. A exposição em saliva resultou em diminuição significativa da adesão de *C. albicans*. Os autores concluíram que não houve correlação entre a energia livre de superfície dos materiais e a aderência de *Candida*. A película salivar reduziu a aderência de *C. albicans* para todos os materiais, associado ao processo de filtragem da saliva que reteve proteínas como a mucina, a qual pode aumentar a aderência de *Candida*. O resultado mais significativo, segundo os autores, foi a menor aderência do micro-organismo sobre os materiais

experimentais comparados aos materiais comercialmente disponíveis Trevalon e Molloplast-B.

Ishihara et al.<sup>54</sup> (1998) relataram que a quantidade de proteínas plasmáticas adsorvidas de polímeros fosfolipídicos contendo 2-metacrilóiloxietil fosforilcolina (MPC) é reduzida comparada com a quantidade de proteínas adsorvidas do poli (2-hidroxiethyl metacrilato – HEMA), poli (n-butylmetacrilato – BMA) e BMA copolímeros com acrilamida (AAM) ou N-vinil pirrolidona (VPy) contendo frações hidrofílicas. Para elucidar a razão da redução da adsorção de proteínas pelo MPC, a estrutura de água nos polímeros hidratados foi examinada com foco na fração de água livre. A hidratação de polímeros ocorre quando os mesmos são imersos em água. As análises de diferentes escaneamentos colorimétricos revelaram que as frações de água nos poli (MPC –BMA) e poli (MPC-n-dodecil metacrilato) com fração molecular de MPC de 0,30 foi em torno de 0,70. Por outro lado, as frações de água livre nos poli (HEMA), poli (AAM-BMA) e poli (VPy-BMA) foi de cerca de 0,42. As alterações conformacionais nas proteínas adsorvidas nos polímeros MPC e poli(HEMA) foram determinadas por mensurações usando espectroscopia ultravioleta e dicroísmo circular. A adsorção proteica em poli (HEMA) mudou consideravelmente, mas a adsorção no poli (MPC-BMA) com fração molar de 0,30 diferiu pouco no estado nativo. Os autores concluíram que poucas proteínas são adsorvidas e sua conformação original não foi alterada nas superfícies poliméricas, as quais apresentam grande quantidade de água livre.

Radford et al.<sup>99</sup>, no mesmo ano, compararam a capacidade de aderência da *C. albicans* (com e sem alterações fenotípicas) sobre superfícies de uma resina acrílica termopolimerizável (Trevalon) e dois materiais reembasadores (Molloplast B e Novus) com diferentes rugosidades superficiais. Foram confeccionados 30 corpos-de-prova de cada material, unidos dois a dois e uma das hemi-partes de cada um foi polimerizada contra duas lâminas de vidro e não receberam acabamento (controle). A outra hemi-parte dos corpos-de-prova da resina termopolimerizável recebeu acabamento com fresa de aço ou com lixas de carbetto de silício, para os reembasadores. Colônias com e sem alterações morfológicas foram obtidas a partir de uma cepa padrão de *C. albicans* e incubadas por 18 a 20 h em caldo nutriente. Em seguida, uma suspensão celular ( $10^7$  log/mL) foi incubada durante 1 h em placas de cultura contendo uma amostra em cada orifício. Decorrido este período, os corpos-de-prova foram secos, acondicionados em lâminas de vidro e corados. Foi utilizada a técnica de amostra estratificada para

contagem das leveduras e hifas aderidas. Não houve diferença estatisticamente significativa na adesão dos dois tipos de *C. albicans* para as leveduras. Ainda, estes tipos morfológicos apresentaram maior aderência nas superfícies nos materiais reembasadores e/ou com acabamento comparado com a resina termopolimerizável. *C. albicans* com alteração fenotípica promoveu maior formação e aderência de hifas, mas não houve diferença significativa na aderência entre os diferentes materiais. Os autores concluíram que maior aderência de micro-organismos é esperada em superfícies rugosas dos materiais reembasadores em relação às superfícies lisas da resina termopolimerizável.

Ainda em 1998, Taylor et al.<sup>122</sup>, compararam o efeito do acabamento de superfície dos materiais dentários na contaminação pelos micro-organismos *Streptococcus oralis*, *Actinomyces viscosus* e *Candida albicans* em resina acrílica e em ligas de cobalto-cromo polidas, jateadas (com areia fina e grossa) e com banho de eletrobrilho. As suspensões de células foram padronizadas e incubadas com os materiais de teste durante 1 hora a 37°C, e em seguida, as células foram contadas por meio de análise de imagem. A retenção de células bacterianas foi substancial (*S. oralis* 12% a 20% e *A. viscosus* 9% a 16%), independentemente do acabamento de superfície. Retenção máxima foi observada nas ligas de cobalto-cromo submetidas a jato de areia fina e eletrobrilho. Para a *C. albicans*, um aumento na rugosidade da superfície resultou em aumento de adesão (3% a 9%). Concluiu-se que o tamanho das células e o tipo de rugosidade afetaram significativamente a retenção de micro-organismos nas superfícies.

No ano seguinte, Millsap et al.<sup>79</sup> relataram que as interações adesivas entre *Candida albicans* e bactérias orais podem desempenhar um papel crucial na colonização microbiana de resinas acrílicas de base de próteses, culminando na estomatite protética. Dessa forma, os autores avaliaram a influência da saliva sobre as interações adesivas entre *C. albicans*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii* em superfícies acrílicas. Primeiramente, as bactérias foram aderidas ao acrílico, e a seguir, as leveduras foram depositadas. Os micro-organismos foram avaliados na presença ou ausência de saliva humana. Todas as experiências foram realizadas numa câmara de fluxo de placas paralelas e a quantificação celular foi feita *in situ*, com um sistema de análise de imagem. Na ausência de bactérias, a adesão de *C. albicans* foi maior em presença de saliva. No entanto, quando na presença de bactérias, adesão da levedura em presença de saliva foi aumentada, indicando que os componentes

salivares específicos constituem uma ponte entre as bactérias e as leveduras. Em todos os grupos agregados de 3-5 células de levedura aderidas à superfície foram observados. Uma análise das superfícies de células microbianas, baseada nas propriedades físico-químicas da superfície sugere que a ponte é mediada por interações ácido-base, uma vez que todas as cepas mostram um grande aumento de doadores de elétrons na superfície, sem qualquer alteração em seus potenciais zeta. A análise físico-química da superfície sugere que o *S. sanguis* e *A. naeslundii* podem utilizar um mecanismo diferente para as interações adesivas com *C. albicans* em presença de saliva.

O uso de novos copolímeros poli (sulfobetaína) como revestimentos antiaderentes foi investigado por Lowe et al.<sup>74</sup> (2000). Para isso, dois copolímeros bem definidos com peso molecular próximos foram preparados pela transferência do grupo de copolimerização metacrilato de n-butila (nBuMA) com 10 ou 30% em moles de 2-(dimetilamino) etilmetacrilato (DMAEMA). Copolímeros da sulfobetaína nBuMA-DMAEMA foram obtidos por tratamento destes polímeros precursores com 1,3-propanossultona sob condições suaves. Tanto a ressonância magnética nuclear (RMN) quanto às análises de espectroscopia elementar indicaram que essencialmente todos os resíduos foram derivados do DMAEMA, em ambos os copolímeros. Discos de polimetilmetacrilato (PMMA) foram revestidos com os copolímeros de sulfobetaína nBuMA-DMAEMA e as propriedades bioaderentes destes materiais revestidos foram comparados com os de PMMA sem revestimento. *Pseudomonas aeruginosa*, macrófagos humanos e fibroblastos 3T3 de ratos embrionários foram utilizados para o teste de efetividade microbiológica da sulfobetaína. Foi observada menor diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) as bactérias, macrófagos e fibroblastos aderidos ao PMMA revestido com sulfobetaína comparado com o PMMA não revestido. O copolímero poli (sulfobetaína nBuMA) contendo a proporção mais elevada (30 % mol) de resíduos de sulfobetaína DMAEMA, foi o revestimento anti-bioaderente mais eficaz.

No mesmo ano, San Millán et al.<sup>110</sup> avaliaram o papel da saliva na adesão *C. albicans* ao poliestireno, assim como o efeito inibitório salivar, observado em secreções salivares IgA, de três mAbs contra epítopos de nanoproteínas de parede celular. A fixação de *Candida albicans* em materiais plásticos de próteses dentárias ou a adsorção de macromoléculas salivares na sua superfície tem sido associada ao desenvolvimento de mucosite. Os autores relataram, em estudos anteriores, que a

adesão de *C. albicans* ao poliestireno pode ser parcialmente inibida com um Acm utilizado contra polissacarídeos da parede celular de *C. albicans* em um sistema modelo para estudar a adesão deste micro-organismo a materiais plásticos. Na ausência de saliva, a adesão de *C. albicans* 3153 aumentou durante a germinação. No entanto, a presença de saliva aumentou a adesão de células de levedura de *C. albicans* 3153 ao poliestireno, mas diminuiu a adesão das células germinadas. O aumento da adesão de células de levedura ao poliestireno mediada pela saliva foi confirmado com a utilização de uma cepa mutante agerminada de *C. albicans* 3153. A inibição da adesão de *C. albicans* 3153 germinativas ao poliestireno foi associada ao sIgA salivar, tendo em vista que a redução deste componente salivar aumentou a adesão de *C. albicans* 3153 ao poliestireno. O efeito inibidor mediado por IgA não foi relacionado com a inibição da germinação, mas com o bloqueio de adesinas expressas na superfície dos tubos germinativos da parede celular. Os três mAbs estudados reduziram a adesão de *C. albicans* 3153 ao poliestireno em níveis equivalentes aos sIgA purificados. A maior redução na adesão foi obtida com o IgA mAb N3B. Os melhores resultados foram obtidos quando os três mAbs foram combinados. Ainda, os autores sugeriram que a saliva desempenha um papel diferente na adesão de *C. albicans* a poliestireno dependendo da fase morfológica da *C. albicans*, o que pode trazer novos insights sobre o papel conflitante de saliva na adesão de *C. albicans* a materiais plásticos de próteses dentárias.

Shay et al.<sup>114</sup>, também em 2000, realizou uma revisão, comparação e atualização das estratégias comumente empregadas para a correta higienização de próteses removíveis. Micro-organismos do gênero *Candida* são mais comumente associados com a placa presente nas próteses. Além disso, as irregularidades de superfície provocam um aumento em sua área disponível, aumentando o número de nichos que seriam facilmente limpos pela ação da língua e musculatura orofacial. Isto pode ser aplicado para as resinas acrílicas das próteses e para os materiais reembasadores autopolimerizáveis, os quais apresentam, geralmente, maior quantidade de poros e superfícies menos polidas que as resinas acrílicas de base de prótese. Dessa forma, torna-se necessária a correta higienização das próteses a fim de evitar o aparecimento da estomatite protética. O método mais comum de limpeza das próteses é a escovação mecânica com escova e água quente ou fria. Um método menos usual, porém mais efetivo que a limpeza mecânica, é o uso de limpeza ultrassônica em água ou outros agentes detergentes. Métodos químicos para limpeza de próteses incluem o

uso de soluções caseiras, comerciais, exposição ao oxigênio e energia de micro-ondas. A solução caseira mais comum é o hipoclorito de sódio diluído em água na proporção 1:10. Apesar de efetiva no combate dos micro-organismos, esta solução provoca o branqueamento e corrosão dos elementos metálicos das próteses removíveis. O uso do vinagre (solução de ácido acético) também se mostrou efetivo na adesão microbiana, mas pode lesionar os tecidos mucosos. Suspensões de nistatina têm sido empiricamente sugeridas como adjuntos no tratamento de estomatite protética. Produtos efervescentes para limpeza de próteses, compostos por perborato alcalino ou carbonato, são utilizados para imersão das próteses por 10 minutos até imersões noturnas. Há controvérsias sobre a real efetividade destes produtos na diminuição da adesão microbiana. O uso da irradiação em micro-ondas mostrou-se efetivo na eliminação de microrganismos, mas não eliminou antígenos irritantes.

As propriedades superficiais dos materiais utilizados para confecção das próteses são importantes do ponto de vista clínico, uma vez que podem interferir no acúmulo de placa, manchamento e conforto do paciente. A rugosidade superficial, particularmente, provoca retenção e aderência de *Candida albicans* e pode estar relacionada à estomatite protética. Zissis et al.<sup>142</sup> (2000), considerando esses aspectos, avaliaram a rugosidade de resinas para base de prótese e resinas reembasadoras. Para confecção dos corpos-de-prova, foram selecionadas quatro resinas para base de prótese (Microbase, Trevalon, MC Acron, SR 3/60 Plus), nove resinas reembasadoras rígidas (Light Liner Hard, Triad Reline, Lighton-U, Triad DualLine, Rebaron LC, Astron LC, Rebaron, Probase Cold, SR3/60 Triplex) e sete resinas reembasadoras resilientes (Perform Soft, Light Liner Soft, Resiline, Astron LC, Mollosil, Mollosil + varnish, Molloplast B, Molloplast B + varnish, Permafex + varnish). Cinco corpos-de-prova de cada material foram obtidos e armazenados em água destilada, a 37 °C, durante um mês, previamente aos testes. Cinco leituras de rugosidade, por mapeamento (scanning), foram realizadas em cada amostra e o valor médio de rugosidade (Ra) obtido. Os resultados evidenciaram que os valores de Ra obtidos para os materiais avaliados variaram de 0,7 a 7,6 micrômetros, sendo que para os materiais para base de prótese esses valores variaram entre 3,4 e 7,6 micrômetros. Entre esses materiais, os menos rugosos foram: a resina SR3/60 Plus (resina termopolimerizável de alto impacto) e a Trevalon (resina termopolimerizável convencional). As duas resinas acrílicas termopolimerizadas em micro-ondas exibiram maiores rugosidades de superfície comparadas àquelas termopolimerizadas convencionalmente. Considerando

os materiais reembasadores rígidos, os valores de Ra variaram entre 0,7 e 4,4 micrômetros, enquanto os valores para os materiais reembasadores resilientes auto, foto e termopolimerizáveis foram de 0,7 a 4,1. Como os materiais testados exibiram rugosidades maiores do que 0,2 micrômetros, que é considerado o limiar abaixo nenhuma redução da aderência de fungos e bactérias pode ser esperada, os autores concluíram que há possibilidade de acúmulo de placa em todos os materiais testados.

O objetivo do estudo de Hasegawa et al.<sup>43</sup> (2001) foi obter uma membrana de proteína resistente à adsorção para a hemodiálise. Para isso, foi preparado um polímero de misto composto de polissulfona (PSF) e polímero 2-metacrilóiloxietil fosforilcolina (MPC) (PSF/polímero MPC). O conteúdo do polímero MPC no PSF foi de 7 e 15% em peso. A membrana assimétrica porosa foi obtida pelo método de processamento seco/úmido de membrana. A caracterização da superfície da membrana de polímero PSF/MPC por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) revelou que o polímero MPC ficou localizado na superfície. A força mecânica da membrana polimérica PSF/MPC não foi alterada comparada com a membrana de PSF. Por outro lado, a permeabilidade do soluto abaixo de um peso molecular (Mw) de  $2,0 \times 10^4$  através da membrana PSF aumentou com a adição do polímero de MPC, a qual é considerada um efeito da característica hidrofílica do polímero MPC. A quantidade de proteína adsorvida sobre a membrana do plasma PSF foi reduzida pela adição do polímero MPC. A permeabilidade da proteína de baixo peso molecular (Mw =  $1,2 \times 10^4$ ) não se alterou mesmo depois de a membrana de polímero PSF/MPC entrou em contato com a solução de proteína plasmática, durante 4 horas, ao passo que diminuiu dramaticamente no caso do PSF membrana. A adesão das plaquetas foi também suprimida de forma eficaz na membrana de polímero PSF/MPC. Com base nestes resultados, os autores concluíram que o polímero MPC poderia ser considerado como um aditivo polimérico duplamente funcional, isto é, capaz de gerar uma característica de resistência à absorção de proteínas e ainda tornar a membrana hidrofílica.

No mesmo ano, Konno et al.<sup>60</sup> avaliaram as nanopartículas de ácido poli (L-láctico) com polímero fosforilcolina 2-metacrilóiloxietil (MPC), o qual apresenta excelente compatibilidade com o sangue. As nanopartículas foram preparadas por uma técnica de evaporação do solvente usando o polímero anfifílico solúvel em água MPC como um emulsificante e modificador de superfície. O diâmetro e potencial zeta das nanopartículas obtidas dependem fortemente da concentração do polímero MPC. Quando as nanopartículas foram preparadas em 1,0 mg/ml de uma solução aquosa de

polímero de MPC, o diâmetro foi de 221 nm, determinado por microscopia de força atômica e medidas de espalhamento de luz dinâmica. A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios x (XPS) indicou que os grupos fosforilcolina no MPC foram localizados na superfície das nanopartículas, isto é, o polímero MPC foi imobilizado nas partículas de PLA e na superfície, cujo potencial zeta foi -2,5 mV. Várias sondas de fluorescência hidrofóbicas poderiam permear através da camada do polímero MPC e adsorver a superfície do PLA. A quantidade de albumina bovina adsorvida sobre as nanopartículas foi significativamente menor em comparação com a do poliestireno convencional em nanopartículas. Sugere-se que as nanopartículas imobilizadas com o polímero MPC tem o potencial para o uso tanto como transportador de drogas e reagentes de diagnóstico os quais podem entrar em contato com o sangue.

A espécie *Candida albicans* é frequentemente associada a muitas infecções relacionadas com o biomateriais. Tipicamente, essas infecções são associadas com a formação de biofilme. Células em biofilmes podem exibir traços fenotípicos que são dramaticamente diferentes os dos seus homólogos planctônicos livres de flutuação e são extremamente resistentes aos antimicrobianos. Consequentemente, as infecções relacionadas a biofilmes são de difícil tratamento e erradicação completa. Ramage et al.<sup>100</sup> (2001) apresentaram um ensaio colorimétrico baseado na microtitulação rápida e de alta reprodutibilidade nos testes de susceptibilidade de biofilmes fúngicos, com base na medição das atividades metabólicas das células utilizando um ensaio de redução do sal de formazan. O ensaio foi realizado para avaliar in vitro a susceptibilidade de várias cepas de biofilmes de *C. albicans* na ação antifúngica da anfotericina B, fluconazol bem como o aumento da resistência destes biofilmes aos agentes antifúngicos. Isolados de *Candida albicans* SC5314, 3153A, ATCC 64550, ATCC 64558, ATCC 76615, ATCC 90028, ATCC 90029 foram mantidas em Sabouraud dextrose a -70°C. O teste antifúngico para determinar as mínimas concentrações inibitórias (MICs) das células planctônicas foi realizado pelo o método de microdiluição. O espectrofotômetro foi utilizado como método de preparação do inóculo correspondente a uma concentração de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  cels/ml de cada uma das cepas avaliadas. Cem microlitros dos inóculos foram adicionados a cada poço de placas de microdiluição contendo 100 µl de solução de fármaco antifúngico. Controle sem antifúngico, também foi incluído. As placas de microtitulação foram, em seguida, incubadas a 35°C por 48 horas. Os testes foram realizados em quadruplicata. Para os testes de suscetibilidade aos antifúngicos das células, os isolados foram

incubados em meio YPD overnight em agitador orbital (100 rpm) a 30° C. Após este período, as células foram centrifugadas e lavadas em PBS. As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com L-glutamina e tamponada com ácido morfolinopropanosulfúrico e a densidade celular equivalente a  $1,0 \times 10^6$  cels/mL, foi determinada. Esta densidade celular foi selecionada, pois estudos prévios consideraram que a formação do biofilme ocorre nesta densidade particular. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços durante 48 horas a 37°C. Após a formação do biofilme, o meio foi aspirado, e as células não aderentes foram removidas por lavagem cuidadosa dos biofilmes três vezes em PBS estéril. PBS residual foi removido com toalhas de papel antes da adição dos agentes antifúngicos. Fluconazol e anfotericina B foram então adicionados aos biofilmes em diluições seriadas de duas concentrações (1,024 a 1 mg/ml e 32 a 0,125 mg/ml, respectivamente, a partir das soluções concentradas de cada agente antifúngico preparado em meio RPMI) e incubou-se por mais 48 h a 35°C. Controles positivos formados pelos biofilmes sem antifúngicos e controles negativos, sem micro-organismos também foram incluídos no desenho experimental do estudo. As MICs sésseis (SMICs) foram determinadas a 50 e 80% de inibição e SMIC50 SMIC80, respectivamente, e mensuradas através do ensaio de redução de XTT. Os testes destes isolados foram realizados em quadruplicata. Devido à sua simplicidade, compatibilidade, alto rendimento e potencial de automatização, os autores acreditam que o teste de XTT representa uma ferramenta promissora para a padronização de suscetibilidade in vitro de antifúngicos testes de biofilmes fúngicos.

Ainda avaliando a utilização dos ensaios colorimétricos de tetrazólio em estudos fúngicos, os quais ocorrem, frequentemente, sem normalização ou correlação com outros métodos, Kuhn et al.<sup>61</sup> (2003) avaliaram o metabolismo de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* através do teste de XTT {2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5- [(fenilamino) hidróxido carbonil]-2H-tetrazólio} e WST-8 [2-(2-metoxi-4-nitrofenil). Cepas de *C. albicans* (M61 e GDH) e *C. parapsilosis* (P/A71, P92, e P177) foram cultivadas em YNB suplementado com glicose 50 mM durante 24 h a 37°C em agitador orbital a 60 rotações por minuto. As células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 10 mL de PBS. Os blastoconídeos foram contadas num hemocitômetro após diluição em série, padronizados, e utilizados imediatamente. Três mililitros da suspensão padronizada de *Candida* foram transferidos para os poços de placas de cultura de 12 orifícios. Cinquenta microlitros

de Solução de XTT e 4 µl de solução menadiona foram adicionados a cada poço. Para determinar a concentração de XTT afetadas pelo sinal colorimétrico, soluções de 1 mg/ml (1X) e 5 mg/ml (5 X) (em PBS), foram utilizadas. As placas foram incubadas a 37°C durante 5 h em agitador orbital, sendo posteriormente a suspensão de cada cavidade centrifugada (5 min a 6000 X g). O produto sobrenadante teve sua densidade óptica a 492 nm (DO492) determinada, usando um espectrofotômetro. Para determinar se algum produto de formazan foi retido pelas células, os sedimentos foram ressuspensos em 3 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 100%, centrifugados e a DO do sobrenadante foi determinada. A contagem de células Kit-8 utiliza o WST-8, o qual, mediante a bio-redução na presença do transportador de elétrons 1-metoxiPMS, produz um formazano corado solúvel em água. Doze placas contendo 3 mL de suspensão de células/poço foram inoculados com 50 µl de solução CCK-8. As placas foram processadas como descrito acima, e a OD450 do sobrenadante foi medida. Cada experimento foi realizado em quadruplicata com intervalo de pelo menos dois dias. Várias conclusões foram determinadas: enquanto os testes de tetrazólio são valiosos para a quantificação dentro de uma cepa fúngica, não pode ser assumido que não existe necessariamente uma correlação linear entre o número de micro-organismo e o sinal colorimétrico; não se pode fazer comparações intra-cepas na ausência de padronização detalhada, uma vez que diferentes cepas podem ser diferentemente metabolizadas, dependendo do substrato; a relação entre a concentração do XTT utilizada e o sinal colorimétrico resultante não é necessariamente proporcional; a quantificação é válida somente após a criação de curvas padrão apropriadas para cada quantidade de tetrazólio usado; enquanto o produto formazano do XTT aparece em solução, uma quantidade significativa pode estar retida intracelularmente em algumas cepas e só se tornam solúveis após tratamento das células com DMSO. A quantidade de produto retido pode variar entre diferentes estados de celulares, por exemplo, planctônicas e biofilme. Em resumo, os estudos que tentam fazer comparações quantitativas de comportamento de diferentes cepas de *Candida* devem considerar variações no metabolismo de XTT. A solubilização do XTT em produto formazano é um passo importante para ensaios celulares planctônicos.

Park et al.<sup>93</sup> (2003) investigaram a capacidade de uma resina para base de prótese com superfície modificada reduzir a adesão de *Candida albicans*. O material avaliado foi incorporado com carga negativa por copolimerização do ácido metacrílico ao metilmetacrilato (MMA). Para isso, amostras com dimensões de 11 x 5 mm e

superfícies altamente polidas foram confeccionadas e divididas em quatro grupos, sendo um controle e três experimentais: controle (MMA); 5% de ácido metacrílico e 95% de MMA; 10% de ácido metacrílico e 90% de MMA; 20% de ácido metacrílico e 80% de MMA. Além do teste de aderência realizado com a *Candida albicans* ATCC 36082 e quantificação das células aderidas microscopicamente após coloração com cristal violeta, as medidas de ângulo de contato das amostras também foram realizadas. Os resultados obtidos demonstraram que, na medida em que a proporção de ácido metacrílico aumentou, a área de superfície de *Candida* aderida e a medida de ângulo de contato diminuíram. Essa hidrofilição das superfícies com proporções aumentadas de ácido metacrílico confirmou a modificação dos valores de energia de superfície das resinas experimentais. A análise quantitativa da área de superfície de *C. albicans* aderida apontou que a diminuição mais significativa da adesão foi observada quando a proporção de ácido metacrílico foi aumentada de 5% para 10%. Esse resultado coincide com as medidas de ângulo de contato, que demonstraram a maior diminuição quando a proporção de ácido metacrílico também foi alterada de 5% para 10%. Baseados nos resultados encontrados, os autores concluíram que, na medida em que as resinas tornaram-se mais hidrofílicas com aumento do ácido metacrílico incorporado, houve diminuição significativa na adesão de *C. albicans*.

Os biomateriais a base de poliuretano são amplamente utilizados nos dispositivos em contato com sangue devido à sua boa biocompatibilidade e propriedades mecânicas. No entanto, sua compatibilidade com o sangue ainda não é perfeitamente adequada e não pode ser indicada para aplicações mais complexas. Dessa forma, a modificação da superfície poderia trazer melhor compatibilidade com o sangue, desde que fossem mantidas as propriedades dos biomateriais. O estudo de Yuan et al.<sup>135</sup> (2003) avaliou a compatibilidade de um biomaterial a base de poliuretano modificado com monômeros zwitteriônicos. Filmes de poliuretano receberam uma deposição de sulfobetaína através de um procedimento composto por três etapas. Primeiramente, as superfícies do filme foram tratadas com hexametileno diisocianato (HDI) em tolueno a 50°C em presença de di-n-butil-estanho dilaurato (DBTDL) como catalisador. A extensão da reação foi medida por ATR-IR. Os espectros foram obtidos pelo número máximo de grupo NCO livre depois de um tempo de reação de 90 min. No segundo passo, o grupo hidroxilo do 4-dimetilamino-1-butanol (DMAB) reagiu em tolueno, com grupos isocianato ligados sobre a superfície. No terceiro passo, sulfobetaína foi depositada sobre a superfície através da

reação de abertura do anel entre amina terciária de DMAB e 1,3 – propanossultona (PS). Esta caracterização foi confirmada por ATR-IR e XPS. Os dados mostraram que as superfícies depositadas foram compostas de sulfobetaína. Os resultados do ângulo de contato mostraram que as superfícies eram altamente hidrofílicas. As superfícies foram ainda consideradas excelentes, uma vez que exibiram baixa adesão plaquetária, o que demonstra sua compatibilidade com o sangue.

Barnabé et al.<sup>5</sup> (2004) verificaram a eficácia de hipoclorito de sódio e sabão de coco na redução da estomatite protética, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Foram selecionados 28 pacientes portadores de prótese total superior, os quais foram divididos em 2 grupos: instruídos a higienizar suas próteses com sabão de coco, seguido de imersão em água destilada por 10 minutos – grupo controle; e higienização da prótese com sabão de coco e imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,05% por 10 minutos. Quinze dias antes do início do experimento, o biofilme das próteses foi coletado e avaliação da mucosa segundo a classificação de Newton foi realizada para verificação de alterações de mucosa. Os tratamentos foram instituídos por 15 dias e, após este período, novas mensurações de biofilme (com isolamento de *C. albicans* e *S. mutans*) e avaliação da mucosa foram realizadas. Dezenove pacientes apresentaram lesões clínicas características de estomatite protética antes do tratamento. O 1º teste microbiológico mostrou uma elevada taxa de *Candida* sp., isolada em 20 pacientes e associada a uma grande quantidade de *S. mutans*. Na 2ª avaliação, somente três pacientes mostraram lesões características de estomatite protética, e houve redução de *C. albicans* em 16 pacientes de *S. mutans* em 10 pacientes, sem diferença significativa nos 2 grupos. Pode ser concluído que o protocolo de limpeza instituído provocou redução significativa da Estomatite protética para ambos os grupos, sem diferença entre os tratamentos.

Infecção de cateteres é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes com hidrocefalia. Com base neste aspecto, Çagavi et al.<sup>14</sup> (2004) compararam as características de colonização bacteriana um material a base de silicone elastomérico revestido com polivinilpirrolidona e dimetilpolissiloxano (de silicone). Para isso, os cateteres com ou sem revestimento foram comparados por métodos in-vivo e in vitro. Para a avaliação in vitro, o cateter revestido de silicone e contaminado com *Staphylococcus epidermidis* foi imerso ou não em solução de vancomicina. No estudo in vivo, o cateter revestido de silicone e as amostras de material foram contaminados com *Staphylococcus epidermidis* e foram introduzidos

nos ventrículos laterais de ratos. Após a inoculação por 1 semana, as peças foram removidas e as colônias quantificadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi observada diferença estatisticamente significativa da colonização nos grupos entre material revestido X silicone, material revestido X silicone tratado com vancomicina, material revestido tratado com vancomicina X silicone revestido de silicone tratado com vancomicina X vancomicina, *in vitro*. Não foram observadas diferenças significativas para a colonização *in-vitro* dos materiais revestidos e tratados com vancomicina. Os experimentos *in-vivo* demonstraram que os cateteres revestidos apresentaram comportamento superior do que os cateteres de silicone na adesão inicial dos micro-organismos, mas após a colonização, a quantidade celular não diferiu. Os autores concluíram que os cateteres revestidos são superiores cateteres *in natura* e impedem a colonização bacteriana em algum aspecto.

No mesmo ano, Harrison et al.<sup>42</sup> verificaram o efeito de várias soluções de limpeza na rugosidade superficial e na remoção de *C. albicans* de um material para base de prótese. Discos cilíndricos de uma resina de base de prótese foram confeccionados da mesma forma quando do processamento de uma prótese. A rugosidade superficial inicial foi avaliada, e as 13 amostras mais lisas foram selecionadas para a realização de um teste microbiológico piloto. Quatro tipos de materiais para limpeza e água (controle) foram utilizados: um creme dental convencional, um creme dental com removedor de manchas, uma pasta de limpeza de prótese e uma solução de limpeza de prótese. Os materiais foram utilizados nas diluições 1:1; 1:2 e 1:3. Os corpos-de-prova foram escovados (15.000 ciclos) em máquina específica com carga de 200g sobre as escovas com um dos cremes testados ou água. As amostras usadas para solução foram imersas por 10 minutos, sendo então lavadas e escovadas em água, de acordo com as instruções do fabricante. Após o ensaio, a rugosidade superficial foi mensurada. O efeito dos tratamentos na remoção de *C. albicans* foi realizado através da contaminação de 13 discos pelo micro-organismo em questão. Após a contaminação a quantidade celular aderida foi determinada pelo plaqueamento da suspensão. Não houve diferença significativa na rugosidade superficial antes e após a escovação. Entretanto, as amostras escovadas com cremes resultaram em superfícies mais rugosas. Não houve diferença de rugosidade entre o controle e a solução de imersão em todas as diluições testadas. Diferença antes e após a escovação foi encontrada para as amostras testadas com as pastas para todas as diluições, mas não entre os materiais. Após o teste de escovação,

para as 3 diluições, diferença significativa foi vista entre as 3 pastas. A limpeza dos discos em água não removeu todos os micro-organismos, ao contrário das amostras limpas com os limpadores, com exceção de um creme dental para prótese na diluição 1:1 e com a solução de imersão na diluição de 1:2.

Ainda em 2004, Henriques et al.<sup>48</sup> (2004) compararam a habilidade de cepas de *Candida albicans* e *Candida dublinenses* se aderirem ao acrílico e a hidroxiapatita (HAP). Com o objetivo de interpretar os resultados de adesão obtidos, as propriedades superficiais (ângulo de contato e espectroscopia fotoeletrônica por raios X – XPS) das células e dos materiais foram determinadas. Cepas clínicas isoladas de *C. albicans* 12A e 46B e de *C. dubliniensis* CBS 7988 foram utilizadas no estudo. As cepas de ambos os micro-organismos foram sub-cultivadas até atingirem a fase estacionária. Em cada ensaio, as células foram centrifugadas (5000 rpm por 10 min) e lavadas com água ultra-pura, e então ressuspensas em certo volume de água ou saliva artificial (pH=6.8) até atingir a concentração necessária em cada ensaio. *Coupons* (8×8×2mm) de HAP e de uma resina acrílica autopolimerizável foram lavados com água, álcool e água estéril ultra-pura e, a seguir, imersos em água estéril ou saliva artificial estéril por 24 horas em temperatura ambiente e secas a 37°C por 24 horas, antes da adesão e das análises das propriedades superficiais (XPS e ângulo de contato). Para a mensuração do ângulo de contato, uma solução de 20 g/l de ágar e 10% (v/v) de glicerol foi colocada sobre a lâmina em um microscópio e então 2mL da solução fúngica ( $10^9$  cels/mL) foi colocada sobre a superfície de ágar, de forma a cobrir toda a superfície. A camada foi seca à temperatura ambiente de 10 a 15 horas e mais duas camadas foram adicionadas, realizando-se a secagem entre elas. Em seguida, foi realizada a mensuração do ângulo de contato. As mensurações foram realizadas a temperatura ambiente, utilizando três diferentes líquidos: água, formamida e 1-bromonaftaleno. Todo o experimento foi feito em triplicata e realizada dez mensurações do ângulo de contato por amostra. Para a mensuração por XPS, 200 mL da suspensão celular aquosa ( $10^9$  cels/mL) foi filtrada em uma membrana de nitro-celulose de 45µm. A membrana, completamente recoberta com as células, foi imediatamente congelada com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a subsequente liofilização. As amostras foram então colocadas em um dissecador, em temperatura ambiente e imediatamente analisadas por XPS. O espectro das células foi registrado seguindo a sequência C 1s, O 1s, N 1s, P 2p e para a HAP e para a resina acrílica foi utilizada a

sequência C 1s, O 1s, N 1s, P 2p, Si 2p, Na 1s, Ca 2p(2p<sub>3</sub> + 2p<sub>1</sub>), K2p(2p<sub>3</sub> + 2p<sub>1</sub>). Além disso, foi analisado o potencial Zeta, através da diluição das células em água e saliva artificial a uma absorbância de 0.1 (mensurada a 600 nm). Já a rugosidade superficial das amostras de HAP e da resina acrílica foi mensurada em um rugosímetro (Surftest SV 512), sendo realizadas as leituras no sentido longitudinal e transversal. Para o ensaio de adesão, os *coupons* de ambos os materiais foram transferidos para placas de 24 orifícios, e em cada poço foi colocado 2mL da suspensão celular 10<sup>7</sup> cels/mL, preparada com saliva artificial ou água. Após 1 hora de incubação a 100 rpm a 37°C, cada poço foi lavado 2 vezes em água ultra-pura de forma extremamente cuidadosa. Em seguida, os *coupons* foram corados com Syto13 por 5 minutos e observados em microscópio de epifluorescência (450-490 nm). Foram capturadas 25 imagens por amostra. O número de células aderidas foi quantificado por um analisador de imagens. Cada experimento foi repetido 6 vezes. Os resultados demonstraram que a adesão foi influenciada pelo tipo de superfície (HAP ou resina acrílica) e pelo tipo de meio onde a adesão ocorreu (água ou saliva). Para cada material não houve diferença entre o número de células aderidas das cepas avaliadas. Quando o meio de inoculação foi a água, o número de células aderidas foi maior para a HAP do que para o acrílico. Estas diferenças não foram observadas para a inoculação com saliva, exceto para a *C. dubliniensis*. Para as amostras de acrílico, a saliva promoveu maior adesão de microorganismos comparada com a HAP. Não houve diferença entre a inoculação entre água ou saliva para as amostras de HAP, exceto para a *C. dubliniensis*.

Jin et al.<sup>57</sup> (2004) verificaram o efeito da saliva humana e dos açúcares da dieta, glicose e galactose na adesão e formação do biofilme de *C. albicans*. Para isso, *C. albicans* 192887 sub-cultivada, isolada da cavidade oral e capaz de produzir um bom biofilme, conforme relatado em outros estudos dos mesmos autores, foi cultivada em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) por 18 horas a 37°C. Uma alçada fúngica foi então inoculada overnight em YNB suplementado com 100 mM de glicose. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão (PBS) e então ressuspensas em YNB (para os experimentos de adesão) ou em PBS (para os experimentos de biofilme), seguindo-se o ajuste da densidade óptica em 0,38 a 520 nm (10<sup>7</sup> cels/mL). Para a determinação das taxas de crescimento em meio glicose e galactose as suspensões celulares (10<sup>6</sup> cels/mL) foram preparadas em YNB suplementado com 100 mM de glicose ou 500 mM de galactose. Cada suspensão foi

inoculada em triplicata e mantida overnight a 37°C. A densidade óptica foi mensurada a 520 nm a cada 2 horas e então a curva de crescimento foi determinada. Para o ensaio de adesão, 100 µl da suspensão celular ( $10^7$  cels/mL) em YNB suplementado com 100 mM de glicose ou 500mM de galactose foi adicionado no interior dos poços de placas de cultura de 96 poços. As placas foram então mantidas por 90 min a 37°C em agitador orbital a 75 rpm. Após este período, as suspensões celulares foram aspiradas, os poços foram lavados 2 vezes com 150 µl de PBS. A formação do biofilme foi realizada de forma semelhante à adesão, sendo que após o período de 90 minutos e as lavagens subsequentes, os poços foram novamente preenchidos com 100 µl da suspensão celular ( $10^7$  cels/mL) em YNB suplementado com 100 mM de glicose ou 500 mM de galactose e então mantidas em agitador orbital a 75 rpm por 96 h a 37°C. O meio de cultura foi trocado diariamente. A saliva foi coletada de 5 adultos saudáveis que não se alimentaram nas 2 horas anteriores à coleta. Foi coletada saliva por 10 min, sendo o frasco mantido em gelo. Após a coleta, a saliva foi misturada e centrifugada a 12000 X g por 15 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi armazenado a -70°C até a utilização. O efeito da saliva foi investigado de duas formas diferentes, pelo recobrimento do substrato com saliva ou pela exposição do biofilme fúngico em saliva e meio de crescimento. Para o recobrimento do substrato, 50 µl de saliva foi colocada no interior de cada poço da placa de cultura e mantida por 4 h a 37°C. A seguir a saliva foi removida e os poços foram lavados 2 vezes com PBS e então foi realizado o procedimento de formação do biofilme como descrito anteriormente. Para a exposição do biofilme em saliva com o meio de crescimento, foram misturados 80 µl de meio de cultura e 20 µl de saliva (grupos teste) ou PBS (controle). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em 3 ocasiões distintas. A mensuração das células aderidas e do biofilme formado foi realizada pelo teste de adenosina trifosfatada (ATP), pelo ensaio de XTT e pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados demonstraram que os ensaios de ATP e XTT podem ser fortemente correlacionados com a contagem de colônias. A comparação dos meios de cultura revelou que a suplementação com galactose promoveu menores níveis de adesão de *Candida* e formação do biofilme, mas um maior pico de desenvolvimento de biofilme ao longo do tempo (96 h). A deposição de saliva sobre o substrato promoveu pouco efeito tanto na adesão como na formação do biofilme, enquanto que a adição de saliva ao meio de cultura afetou quantitativamente a formação do biofilme, especialmente no

dia 3 e 4, sem qualquer efeito significativo na adesão. Os autores concluíram que a formação do biofilme de *C. albicans* pode ser modulada por fatores dietéticos e salivares e que são necessárias maiores investigações para elucidar estas interações complexas.

Ainda em 2004, Richmond et al.<sup>104</sup> avaliaram a resistência à abrasão e a rugosidade superficial de dois materiais de base utilizados pela técnica de injeção (SR-Ivocap “Plus” e Ipsyl 60 RV) e um material utilizado na técnica de moldagem por compressão (Trevalon). Um quarto grupo de amostras preparadas com a resina Trevalon, empregando a técnica de moldagem por injeção, foi confeccionado para posteriores comparações. Foram confeccionadas 10 amostras para cada grupo, as quais foram armazenadas por 7 dias a 37°C. A máquina de escovação utilizada realiza cerca de 320 ciclos/minuto. Os autores optaram pela escova dental Oral B-40 e por um dentifrício a base de carbonato de cálcio, diluído em água destilada na proporção de 1:1. Cada amostra foi pesada antes da realização do teste de escovação. Foram realizadas pesagens a cada 20.000 escovações, até serem realizados 100.000 ciclos, totalizando 5 pesagens em cada amostra. Para análise das alterações superficiais provocadas pela escovação, foi utilizada a medida de rugosidade superficial antes e depois dos ensaios de escovação. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de materiais e nem entre as amostras de resina Trevalon quando injetadas ou prensadas para a perda percentual em massa. O material de base SR Ivocap “Plus” obteve a menor rugosidade dos três grupos, enquanto a resina Ipsyl RV 60 apresentou os maiores valores de rugosidade. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras injetadas ou prensadas da resina Trevalon quanto à textura superficial.

Apesar das vantagens apresentadas pelos copolímeros à base de fosfobetaína, a exigência de métodos sofisticados para confecção desses polímeros e o alto custo limitam sua ampla aplicação. Assim, no estudo de West et al.<sup>131</sup> (2004), copolímeros contendo moléculas de sulfobetaína ou fosfobetaína foram comparados quanto à adesão celular e bacteriana e resistência à adsorção de proteínas. Os copolímeros foram preparados por meio de uma técnica de polimerização de radicais livres, sendo um composto por sulfobetaína (SB1036) e o outro por fosfobetaína (PC1036). Discos de polimetilmetacrilato (PMMA) e vidro, cujas dimensões eram de 13 x 0,5 mm, foram imersos nos copolímeros avaliados, SB1036 ou PC1036, e comparados com grupos controles compostos por discos não recobertos. A avaliação da adesão

bacteriana, por meio do teste de ATP, foi realizada após 4 horas de contaminação com  $1 \times 10^8$  cels/mm de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Macrófagos humanos e granulócitos foram utilizados para avaliar a adesão e ativação de células inflamatórias, enquanto, células de fibroblastos 3T3 de ratos foram utilizadas para avaliar a propensão dos materiais para suportarem a adesão de fibroblastos. Os autores também avaliaram a adsorção de proteínas e os ângulos de contato dinâmicos dos materiais. Os resultados demonstraram que as amostras de vidro e PMMA recobertas com PC1036 apresentaram menores valores de adesão bacteriana, enquanto as amostras com SB1036 apresentaram valores similares às amostras controles. Em todos os outros testes de adesão celular foram encontrados menores valores nos substratos recobertos com PC1036, comparados aos substratos com SB1036 ou aos controles. Não houve evidência de toxicidade para nenhum dos materiais avaliados. Os resultados de adesão proteica revelaram que a adsorção de proteínas variou de acordo com os diferentes substratos. Os resultados de ângulos de contato indicaram que, inicialmente, a cobertura SB1036 apresenta-se mais hidrofílica, entretanto, ocorre um rearranjo no polímero PC, tornando o polímero PC1036, posteriormente, mais hidrofílico. Ainda, foi observado que existe uma diferença clara na adesão das diferentes bactérias aos materiais recobertos pela sulfobetaina, o que pode ser consequência das diferentes cargas de superfície dos micro-organismos ou de sua propensão a se aderir às proteínas adsorvidas. Embora a fosfobetaina e a sulfobetaina sejam ambas componentes zwitteriônicos, as diferenças por elas apresentadas podem ser consequência da capacidade de adesão de água. O ângulo de contato inicialmente alto do PC1036 ocorre porque os polímeros PC apresentam um componente lauril, que é hidrofóbico e expresso na superfície em contato com o ar. Uma vez molhada a superfície, um baixo ângulo de contato é obtido. Por outro lado, os polímeros de sulfobetaina apresentam menores ângulos de contato iniciais, devido à expressão reduzida do grupo lauril na interface com o ar, mas torna-se menos hidratada após o molhamento, resultando em maiores ângulos de contato. Outra explicação para os diferentes comportamentos dos polímeros é que a fosfobetaina tem um grupo amônia quaternária terminal, enquanto o grupo sulfato é o grupo terminal nas sulfobetainas. A mobilidade do grupo amônia pode aumentar a capacidade da fosfobetaina de manter a água ao redor do grupo fosfato aniônico. Os diferentes potenciais elétricos de superfícies desses componentes zwitteriônicos também podem contribuir na variação da adesão celular e proteica, por meio da modificação de

interações eletrostáticas entre as moléculas biológicas e as superfícies. Diante dos resultados encontrados, os autores concluíram que as coberturas de fosfobetaína e a sulfobetaína demonstraram resultados positivos comparados aos substratos controles, sendo a fosfobetaína claramente superior à sulfobetaína.

A resistência à abrasão por escovação e a rugosidade superficial foi avaliada por Mendonça et al.<sup>78</sup>, em 2006. Os autores verificaram o efeito da escovação sobre a resistência à abrasão e sobre a rugosidade superficial de três resinas para reembasamento rígidas e uma resina termopolimerizável para base de prótese. Vinte e quatro corpos-de-prova (40x10x2mm) de cada material foram confeccionados e divididos em três grupos, sendo um controle, que não recebeu tratamento térmico, outro que recebeu tratamento térmico em água a 55°C por 10 minutos para as resinas de reembasamento e por 60 minutos para a resina termopolimerizável e outro que foi submetido à energia de micro-ondas a 650W por 4 minutos para o material Duraliner II, por 5 minutos a 550W para o material Kooliner, por 4 minutos a 550W para Tokuso Rebase e por 3 minutos a 500W para Lucitone. Após os tratamentos, os corpos-de-prova foram escovados em máquina específica, com solução 1:1 de água destilada e dentifrício Colgate Bicarbonato de sódio, realizando-se 20.000 ciclos de escovação, sob carga constante de 200 gramas. A escova dental utilizada foi a Tek, com cerdas duras. Antes e após o ensaio de escovação, os corpos-de-prova foram pesados até atingir massa constante e a rugosidade superficial também foi mensurada. Não houve diferença significativa na resistência à abrasão entre os 3 grupos para os materiais Duraliner, Kooliner e Lucitone. Entretanto, para o material Tokuso Rebase, a imersão em água e a irradiação em micro-ondas provocaram aumento na abrasão por escovação ( $P < 0,05$ ) comparada com o controle. Comparações dos resultados com o grupo controle mostraram que os materiais Duraliner e Tokuso apresentaram menor perda de massa que a resina Lucitone, a qual foi estatisticamente semelhante ao material Kooliner. Após os tratamentos de polimerização complementar, não houve diferença entre as médias de perda de massa para todos os materiais avaliados ( $P > 0,05$ ). A rugosidade superficial do material Duraliner não foi influenciada pelos tratamentos, enquanto que Kooliner exibiu aumento da rugosidade comparada com o controle. A irradiação em micro-ondas resultou em aumento da rugosidade superficial mensurada antes e após o ensaio de escovação, para o material Tokuso Rebase e para Lucitone. A escovação promoveu aumento da rugosidade superficial em todos os

grupos avaliados. O tratamento térmico não influenciou a rugosidade do material Lucitone.

No mesmo ano, Moura et al.<sup>84</sup> avaliaram a influência da saliva humana na aderência de espécies de *Candida* em superfícies de resina acrílica polimerizadas termicamente ou por meio de micro-ondas, e verificaram se essa aderência foi influenciada pela rugosidade superficial e energia livre de superfície. Foram confeccionados um total de 256 corpos-de-prova (2,5 x 1,2 x 0,2 cm) de resina termopolimerizável (Clássico) e polimerizada por meio de micro-ondas (Ondacryl). Após o acabamento realizado com lixas de granulação 320, 400 e 600, o polimento foi realizado utilizando escova e pedra pomes, durante 1 minuto em cada superfície. A rugosidade superficial dos corpos-de-prova obtidos foi analisada por rugosímetro, e aqueles corpos-de-prova com desvio padrão altos foram descartados. Todos os espécimes foram limpos com ultrassom por 20 minutos, e imersos em água destilada, a 37°C, por 12 horas, para liberação do monômero residual. Após esses procedimentos a rugosidade superficial e o ângulo de contato da superfície dos corpos-de-prova foram mensurados. As leituras de ângulo de contato foram realizadas 3 vezes obtendo-se a média. Após as mensurações, os corpos-de-prova foram colocados em ultrassom por 20 minutos, lavados com água destilada estéril e novamente colocados em ultrassom por mais 20 minutos. Os espécimes foram, então, aleatoriamente divididos em 2 grupos: pré-condicionados com saliva durante 30 minutos e grupo controle sem pré-condicionamento com saliva. A saliva estimulada foi obtida de um único doador, centrifugada a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante da saliva foi utilizado para o pré-condicionamento de metade dos corpos-de-prova por 30 minutos para a formação da película adquirida. Asépticamente, os corpos-de-prova foram transferidos para tubos contendo suspensão (1 a 5 x 10<sup>6</sup> cels/ml) de uma das quatro espécies de *Candida* avaliadas: *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. dubliniensis* CD 36 ou *C. glabrata* ATCC 2001, onde permaneceram por duas horas a 35°C. Após esse período os corpos-de-prova foram removidos e gentilmente lavados em PBS, por 75 segundos, e com etanol 80% para fixar o micro-organismo e, então, corados por 1 minuto com cristal violeta e novamente lavados com PBS. A aderência dos micro-organismos foi avaliada pela contagem das colônias utilizando um microscópio óptico (x 400). De acordo com os resultados encontrados pelos autores, nenhuma diferença significativa na rugosidade superficial entre os materiais foi detectada, assim como a rugosidade parece não interferir na aderência das espécies de

*Candida*. Os valores de energia livre de superfície foram significativamente diferentes, sendo que a resina termopolimerizável apresentou os maiores valores. Segundo os resultados obtidos, a presença ou ausência de saliva e as diferentes espécies de *Candida* influenciaram significativamente a aderência dos micro-organismos, mas eles não foram influenciados pelo método de polimerização das resinas. A presença da saliva humana influenciou a contagem das espécies de *Candida*, resultando em uma diminuição nos valores de aderência para *C. albicans* e *C. tropicalis*, aumentando para *C. dubliniensis* na superfície da resina termopolimerizável. *C. glabrata* não teve o seu crescimento influenciado pela saliva. Para a resina polimerizada por meio de micro-ondas foi observado crescimento de *C. albicans* na presença de saliva e nenhum efeito significativo foi verificado para *C. dubliniensis* nas mesmas condições. Os autores concluíram que o método de polimerização não influenciou os valores de aderência de *Candida* e que não há correlação entre a energia livre de superfície, a rugosidade superficial e a adesão das espécies de *Candida* avaliadas neste estudo.

O objetivo do estudo de Al-Bakri et al.<sup>1</sup> (2007) foi examinar e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas indígenas da Jordânia, dissolvidas em dimetilsulfóxido, utilizando o rápido ensaio de XTT e métodos de contagem de viáveis. Quatro cepas diferentes de bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foram utilizadas. As amostras dos extratos de plantas utilizadas para o estudo foram coletadas de diferentes partes da Jordânia durante a primavera / verão 2005 ou adquiridas no mesmo período e foram secas à temperatura ambiente e então moídas. Agentes antimicrobianos convencionais foram usados para medir a susceptibilidade global das cepas bacterianas. O ensaio rápido de XTT foi usado para a triagem inicial da atividade antimicrobiana dos extratos das plantas. A atividade antimicrobiana dos extratos de plantas potencialmente ativos foi ainda avaliada utilizando o método de contagem de colônias. Quatro graus de atividade antimicrobiana (alto, moderado, fraco e inativo) contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, foram registados. Os extratos de plantas de *Hypericum triquetrifolium*, *Ballota undulata*, *Ruta chalepensis*, *Ononis natrix*, *Paronychia argentea* e *Marrubium vulgare* mostraram atividade antimicrobiana promissoras. Este estudo mostrou que, embora ambos os métodos XTT e contagem de colônias possam ser utilizados para estimar a

atividade antimicrobiana global de substâncias experimentais, não há uma forte correlação linear entre os dois métodos.

Cheng et al.<sup>20</sup> (2007), baseado em estudos recentes, propuseram determinar a capacidade de resistência da adesão não específica e formação de biofilme de duas bactérias: *S. epidermidis* (Gram positiva) e *P. aeruginosa* (Gram negativa) sobre uma superfície recoberta por pSBMA – poli (metacrilato de sulfobetaina) zwitteriônico em diferentes espessuras de superfícies. Para os testes foram preparados três tipos de SAMs (monocamadas de self-assembled de alcanetiol): 1-OEG (oligoetilenoglicol de cadeia curta); 2-mistura de  $\text{SO}_3^-/\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ; e 3- SAMs com terminação  $(\text{CH}_3)$ . Amostras de vidro foram inicialmente recobertas com uma camada de 2 nm de espessura de cromo para promover a adesão e uma camada de ouro ativo (48 nm) pela deposição de elétrons sob vácuo. Previamente a cobertura do SAM, a cobertura de ouro sobre o vidro foi limpa com etanol e água destilada, e seca com  $\text{N}_2$ , e então exposta ao ozônio UV por 20 minutos, seguida de água destilada e etanol e seca com  $\text{N}_2$ . Para preparar o  $\text{CH}_3$  e o OEG a limpeza foi realizada com uma solução 0,1 mM de etanol de 1-dodecanetiol ou terminação hidroxil-OEG por 24 horas para formar SAM sobre a superfície de ouro, e a amostra foi lavada na sequência com etanol e água e seca em atmosfera de  $\text{N}_2$ . Para preparar a mistura AS/TMA SAM, as amostras foram imediatamente limpas em solução 0,2 mM de TMA e SA de PBS (pH7.4) por 24 horas para formar a mistura de SAM na superfície de ouro, e então, foi lavada com etanol e água e secos em atmosfera de  $\text{N}_2$ . Após serem lavados pSBMA e pOEGMA foram polimerizados em substratos com ouro de acordo com estudos prévios. Nesse estudo para mensurar a adsorção de proteína sobre a superfície recoberta foi utilizado um sensor da ressonância de plasma da superfície (SPR) com um detector sensível de superfície monitorando a interação superfície-proteína em tempo real. Foi utilizada uma solução de fibrinogênio de 1,0 mg/mL em PBS (0,15M, pH 7.4) para escoar na razão de 0,05mL/min. *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* PAO1 com expressão plasmídea GFP foram inicialmente cultivadas “overnight”, separadamente, a 37°C em TSB. As culturas foram incubadas a 37°C em shaker a 100 rpm por 18 horas e então utilizadas para inocular uma segunda cultura de cada espécie em 200 mL de meio apropriado. Câmara de fluxo laminar nas dimensões 300 x 38 x 3,5 mm foram utilizadas. Amostras de vidro com 12 mm foram recobertas com filmes poliméricos ou orgânicos. De acordo com autores, a adesão de bactérias é influenciada pelo preparo da superfície e pela estabilidade da cobertura ou tratamento. A polimerização por transferência do

radical atômico (ATRP) e o auto ensaio são dois métodos para criar superfícies bem estruturadas com cadeias longas e curtas. Os resultados obtidos demonstraram que o sinal de SPR foi diferente em função do tempo em diferentes superfícies. A resistência à adsorção de fibrinogênio não-específica foi alta para pSBMA, a mistura AS/TMA SAMs e OEG SAMs, enquanto que para o controle de ouro e a superfície hidrofóbica CH<sub>3</sub>SAMs houve alta adsorção de fibrinogênio. Foi encontrada diminuição significativa na adesão de *S. epidermidis* sobre pSBMA, pOEGMA e as misturas AS/TMA SAMs e OEG SAMs quando comparados aos controle vidro e CH<sub>3</sub> SAMs. Não houve diferença significativa entre as quatro superfícies para a resistência de adesão de bactéria. A adesão de *S. epidermidis* sobre a superfície hidrofóbica (CH<sub>3</sub> SAMs) foi 45% maior comparada ao vidro ( $p < 0.05$ ). A adesão de fibrinogênio foi reduzida para as misturas AS/TMA SAMs, OEG SAMs, pSBMA e pOEGMA. Para a adesão da *P. aeruginosa*, o vidro apresentou a maior adsorção de bactéria após 3 horas. A adesão sobre o OEG SAMs foi reduzida em 87% em comparação com a superfície de vidro, quando comparado a mistura AS/TMA SAMs foi 30% maior, não havendo, entretanto, diferença entre as duas superfícies ( $p > 0.05$ ). A adesão de *P. aeruginosa* sobre pSBMA e pOEGMA foi reduzida para 80 e 75%, respectivamente, quando comparada ao OEG SAMs e nenhuma diferença significativa foi observada entre pSBMA e pOEGMA. A menor adesão de *P. aeruginosa* no pSBMA e pOEGMA sobre a mistura AS/TMA e OEG SAMs foi devida a cadeia molecular longa dos grupos. Foi observado por Roosjen et al. que cadeias mais longas de PEG é mais efetiva comparada a cadeias curtas OEG reduzindo a adesão de *P. aeruginosa*, enquanto o comprimento da escova PEG teve pequeno impacto na adesão de *S. epidermidis*. O pSBMA e pOEGMA tiveram baixa adesão de bactéria, sendo sua capacidade de inibir a adesão de bactérias associada a sua capacidade de hidratação. Tem sido mostrado pelos autores que zwitteriônicos (pSBMA) e cargas misturadas (AS/TMA) encontram moléculas de água via solvente iônico, enquanto polímeros hidrofílicos e neutros (OEG ou pOEGMA) encontram moléculas de água via ponte de hidrogênio. Segundo os autores é interessante observar que hidrofóbicos (CH<sub>3</sub>SAMs) apresentam muito baixa adesão de *P. aeruginosa*, o qual pode ser devido a diferentes mecanismos. A redução da adesão da *P. aeruginosa* sobre superfície hidrofóbica é conhecidamente causada pela baixa energia de superfície do grupo metil. Forças de interação mais fortes entre *S. epidermidis* e a superfície hidrofóbica mediada pelas proteínas de superfície do *S. epidermidis*, presumivelmente, a força de adesão entre *P.*

*aeruginosa* e CH<sub>3</sub> SAMs tem relativamente o maior pico devido ao conteúdo polissacarídeo sobre a superfície da *P. aeruginosa*. Os polímeros pSBMA e pOEGMA exibiram acúmulo de bactéria. No estudo de curto tempo de adesão, a drástica redução da adesão de *P. aeruginosa* sobre a superfície hidrofóbica é antecipada devido ao desprendimento da bactéria através da interface ar-líquido. No estudo a longo prazo, a adesão inicial da bactéria ocorre para sintetizar EPS para aderir-la. Tanto o pSBMA zwitteriônico e pOEGMA hidrofílico/neutro escovados por enxerto via ATRP reduziram dramaticamente a adesão e acúmulo de bactéria. Esta redução foi devida a sua forte hidratação intrínseca via interação eletrostática para pSBMA ou interação ponte de hidrogênio para pOEGMA. Esta redução resulta de cadeias mais longas e densidades maiores. Os resultados sugerem que pSBMA é um excelente material para resistir à adesão a bactérias e formação de biofilme e ATRP é um método excelente para preparar superfícies efetivas.

O objetivo do estudo de Cringus-Fundeanu et al.<sup>23</sup> (2007) foi apresentar um método para prevenir a adesão de micro-organismos das superfícies. Poli(acrilamida (PAAm) foram cultivadas a partir de wafers de silício por átomos de transferência de polimerização radical (PRTA), utilizando um procedimento de reação de três passos que consistem da imobilização do agente de acoplamento C-aminopropiltrióxissilano, da ancoragem de um iniciador de PRTA 4-(clorometil)benzoíla, e da polimerização radical controlada de acrilamida. As superfícies foram caracterizadas por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), espectroscopia de infravermelho, elipsometria e medidas de ângulo de contato. A densidade de PAAm calculada apontou a presença de cadeia polimérica densa e homogênea. Taxas iniciais de deposição, de adesão após 4 h, e descolamento de duas cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Streptococcus salivarius* GB 24/9) e uma cepa de levedura (*Candida albicans* GB 1/2) sobre ambas as superfícies de silício PAAm revestidos e não tratadas foram avaliadas numa câmara de fluxo de placas paralelas. Observou-se uma redução elevada (70-92%) na adesão de micro-organismos à superfície com PAAm comparada com as superfícies não tratadas. A aplicação do PAAm em tubos de silicone confere grande potencial do desenvolvimento de biomateriais para implantes com reduzida taxa de aderência de micro-organismos.

A rugosidade de superfície e a aderência de *Candida albicans* em quatro resinas acrílicas para base de prótese e cinco reembasadores resilientes com diferentes polimentos de superfícies foram estudadas por Nevzatoglu et al.<sup>87</sup> (2007). As

amostras, cujas dimensões eram de 10 x 10 x 2 mm, foram processadas contra o vidro, o gesso ou polidas com pontas carbide de tungstênio. Após a confecção dos corpos-de-prova, as medidas de rugosidade foram registradas, seguidas pela contaminação com *Candida albicans* ATCC 2091 a uma concentração de  $10^6$  cels/ml. Os resultados obtidos demonstraram que os tipos de polimento afetaram os valores de rugosidade de superfície dos materiais testados. Os materiais processados contra as superfícies de vidro apresentaram menores valores de rugosidades, comparados àqueles processados contra o gesso e com pontas específicas. Além disso, eles também apresentaram menor adesão de *Candida albicans*, mas a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa. As resinas acrílicas para base de prótese exibiram menores valores de rugosidade superficial comparadas aos reembasadores resilientes, independente dos métodos de polimerização. O tipo de polimento de superfície não influenciou a adesão de *Candida albicans*, mas, considerando os tipos de materiais, a adesão fúngica foi menor nas resinas acrílicas para base de próteses comparadas aos reembasadores resilientes. Embora os materiais auto e termopolimerizáveis não apresentem diferenças significantes nas rugosidades superficiais, os materiais termopolimerizáveis exibiram menor adesão de *Candida albicans*. Diante dos resultados, os autores concluíram que instruções de higiene oral e programas de manutenção para pacientes com próteses reembasadas devem ser cuidadosamente realizados a fim de evitar a estomatite protética, considerando que a adesão de *Candida albicans* nos materiais reembasadores foi maior do que nas resinas acrílicas para base de prótese.

Tendo em vista a necessidade de métodos de higienização eficazes para impedir o acúmulo de micro-organismos sobre as superfícies, Paraskevas et al.<sup>92</sup>, em 2007, avaliaram o efeito de um dentifrício sobre a eficácia da escovação. Trinta e seis pacientes com a presença de cinco dentes naturais por quadrante participaram do estudo. Os participantes foram divididos em dois grupos: Grupo 1- escovação dos dentes com dentifrício (NaF) durante 2 min (30 s por quadrante, divididos em 15 s por vestibular e 15 s por lingual) e Grupo 2- escovação dos dentes sem dentifrício, imergindo a escova apenas em água. Antes do início do estudo, os participantes foram instruídos a não realizar nenhum método de higiene oral 48 h antes da primeira avaliação. Após este período, os participantes passaram pela primeira avaliação, onde foi realizada a coloração da placa bacteriana e os índices de placa bacteriana foram obtidos. Os participantes, então, ganharam uma escova de dente e foram instruídos a realizar a escovação com e sem dentifrício. No final do procedimento, a placa

bacteriana remanescente foi novamente corada e os índices de placa anotados. Decorrida 1 semana, os pacientes retornaram ao consultório e o mesmo procedimento de não realizar nenhum método de higiene oral 48 h antes da consulta foi adotado. Nesta consulta, nova avaliação da placa bacteriana foi realizada antes da escovação e os procedimentos foram repetidos nos dois grupos e, após a escovação, nova avaliação do índice de placa bacteriana foi realizada. Os resultados mostraram que a escovação com dentifrício resultou em uma média de redução da placa bacteriana de 50%, enquanto que a escovação com água reduziu a placa bacteriana em torno de 56%. De acordo com os autores, a razão para a menor redução de placa bacteriana no grupo de escovação com dentifrício pode estar relacionado aos componentes deste dentifrício, como abrasivos ou detergentes. Estes componentes contribuem para uma diminuição da efetividade do dentifrício na remoção do biofilme. Sendo assim, concluiu-se que o uso de dentifrício não contribuiu para a remoção da placa bacteriana durante a escovação mecânica. Ainda, a ação mecânica fornecida pela escova dental foi o principal fator no processo de remoção da placa bacteriana.

Tari et al.<sup>121</sup> (2007) verificaram o efeito da rugosidade superficial e do tempo de adesão de *C. albicans* em reembasadores resilientes. Para isso, foram confeccionados 50 corpos-de-prova dos reembasadores resilientes Visco Gel, Ufi Gel P e Molloplast B. Do total, 10 corpos-de-prova de cada material foram utilizados para a mensuração da rugosidade superficial e o restante foi usado para o teste de aderência de *C. albicans*. Previamente ao ensaio de aceleração da idade, o qual foi dependente do material e das instruções do fabricante, foram mensuradas a rugosidade superficial e a adesão de *C. albicans* (baseline). Para o teste de adesão, as amostras foram incubadas em saliva coletada de 4 indivíduos saudáveis por 1 hora à 37°C, após centrifugação a 5.000 g por 15 minutos. Após a exposição em saliva, os corpos-de-prova foram incubados com cepas isoladas de *C. albicans* ATCC 90028, por 3 horas a 37°C e as células aderidas foram quantificadas microscopicamente após coloração com técnica de Gram. O tempo de aceleração da idade dos corpos-de-prova foi dependente do material e das instruções dos fabricantes. Os resultados indicaram que o envelhecimento promoveu aumento significativo da rugosidade superficial, sendo maior para o material Visco Gel comparado com Ufi Gel e Molloplast, o qual apresentou a superfície mais lisa. Ainda, o envelhecimento promoveu aumento da adesão de *C. albicans*. Não foram encontradas diferenças significantes entre os diferentes materiais na adesão de *C. albicans*, para amostras iniciais (sem

envelhecimento). O reembasador Molloplast apresentou maior adesão de *C. albicans* após o envelhecimento. A saliva não afetou significativamente a aderência fúngica dos materiais, exceto para as amostras submetidas ao processo de envelhecimento, nas quais a saliva aumentou a aderência fúngica. Os autores concluíram que o envelhecimento dos materiais causa aumento da rugosidade e da adesão de *Candida albicans* o que é agravado pela presença da saliva.

Ainda em 2007, Thein et al.<sup>123</sup> examinaram as interações de biofilme de duas espécies de *Candida*, *Candida albicans* e *Candida krusei*, nas superfícies acrílicas de prótese. Para isso dois isolados de *Candida albicans* (Ca) e dois de *Candida krusei* (Ck), com alta (Cah, Ckh) e baixa (Cal, Ckl) capacidades de formação de biofilmes, foram utilizados. Os biofilmes foram desenvolvidos em superfícies acrílicas aerobicamente a 37°C em meio YNB e o crescimento foi quantificado por unidades formadoras de colônias (UFC). Os autores avaliaram os perfis de população dos biofilmes contendo cada par de espécies de *Candida*, de um total de quatro pares de combinação, depois de 12 horas; o efeito de uma concentração constante de Cah ( $10^7$  cels/mL) nas concentrações variantes de Ckh ( $10^3$  -  $10^7$  cels/mL) sobre o desenvolvimento do biofilme de duas espécies e o efeito da saliva no desenvolvimento do biofilme de duas espécies. A mistura de saliva não estimulada utilizada nesse estudo foi coletada de cinco doadores saudáveis e centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. Além disso, a saliva foi filtrada com uma membrana de 0,22 micrômetros. Os resultados demonstraram que os biofilmes de dupla espécie exibiram menor população de células depois de 9 ou 12 horas comparados aos biofilmes de monoespécie. A *Candida albicans* ( $10^7$  cels/mL) co-cultivada com concentrações iniciais variantes de *Candida krusei* foi inibida em altas concentrações da *C. krusei* ( $10^6$  -  $10^7$  células/mL), e a população dessa última, de maneira geral, foi menor na presença da *Candida albicans*, o que indica um efeito de antagonismo mútuo de *Candida albicans* e *Candida krusei* nos modelos de biofilme de duplas espécies. Todos os biofilmes de monoespécie da *Candida krusei* foram significativamente diminuídos pela presença da cobertura de saliva sobre o substrato acrílico ou pela incorporação de saliva no meio de incubação. Os biofilmes de dupla espécie de *Candida krusei* e os biofilmes de *Candida albicans*, mono ou dupla espécie, não foram afetados pela saliva. Os resultados indicam que características quantitativas e qualitativas de uma espécie de *Candida* modificam a fisiologia de outras espécies fúngicas, e interações competitivas dessas espécies são importantes na co-habitação

em biofilme. Além disso, a saliva humana pode modular esse processo dependendo da natureza e número de espécies.

Em 2008, da Silva et. al.<sup>25</sup> avaliaram se a suplementação com glicose na formulação do XTT poderia melhorar a confiabilidade e reprodutibilidade do teste devido ao fornecimento de nutrientes que permitissem seu caminho nas camadas do biofilme. *Candida albicans* ATCC 90028 foi cultivada aerobicamente a 37°C por 18 horas em Agar Sabouraud dextrose, e então uma alçada foi semeada em YNB suplementado com 50 mM de glicose por 18 horas, até atingir a última fase de crescimento exponencial. Após este período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em PBS (pH 7.2) e então ressuspensas em YNB suplementado com glicose a 100 mM. Para o experimento foi utilizada a suspensão de 10<sup>7</sup> cels/mL, cuja densidade óptica foi ajustada pela escala de McFarland, utilizando o espectrofotômetro Beckman. Esta concentração celular foi utilizada por ser considerada ótima para o desenvolvimento do biofilme. Uma alíquota de 100µl da suspensão celular padrão foi transferida para uma placa de 96 orifícios estéril e incubada por 90 minutos, a 37°C, sob agitação de 75 rpm. Após a fase de adesão, a suspensão celular foi gentilmente aspirada e cada orifício foi lavado duas vezes com PBS para remover as células não aderidas. Em seguida, 200 µl de YNB suplementado com glicose a 100mM foram adicionados em cada poço, e então as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas nas mesmas condições anteriores. A cada 24 horas de incubação, o meio foi aspirado, o biofilme lavado duas vezes com PBS e acrescentado 200 µl de meio fresco. Os tempos de formação de biofilme foram quantificados utilizando o ensaio do XTT. Os procedimentos foram realizados 6 vezes em duas ocasiões distintas. O XTT foi dissolvido em água ultrapura (Milli-Q) a uma concentração final de 1mg/mL, sendo filtrado e armazenado a -70°C até sua utilização. A solução de menadiona foi preparada, imediatamente, no momento do experimento, sendo que a proporção da solução de XTT para menadiona foi o volume de 20:1. O biofilme foi lavado com 200 µl de PBS para remover células não aderidas e a seguir foi colocado em cada orifício: 158 µL de PBS com e sem glicose nas concentrações de 200, 100 e 50 mM; 40 µl de XTT e 2 µl de menadiona. A placa foi envolvida em papel alumínio e a 37°C por 90 minutos, 3 h ou 4 horas. Logo após esse período uma alíquota de 100 µl foi transferida para uma nova placa e a alteração colorimétrica foi mensurada em um espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Foi observado que a incubação com XTT por 180 minutos (3 horas) demonstrou valores mais coerentes para o prosseguimento da

análise. No período selecionado, o biofilme incubado para cada concentração de glicose demonstrou diferença estatisticamente significativa. A adição de glicose foi responsável pela atividade oxidativa, indicando interferência na atividade metabólica e resultando em um menor coeficiente de variação. A adição de glicose aumentou a detecção dos produtos reduzidos do XTT, os formazans, comparado ao controle sem nenhuma adição. Os autores concluíram que o teste XTT suplementado com 200 mM de glicose e o tempo de incubação de 180 minutos foram considerados ideais para se avaliar a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

A adesão de *Candida albicans* e a adsorção de macromoléculas salivares sobre a superfície acrílica de próteses dentárias podem ser consideradas fatores em potencial no desenvolvimento de estomatite protética. Dessa forma, Elguezabal et al.<sup>36</sup> (2008) avaliaram a dupla função da saliva na aderência de *C. albicans* ao polimetilmetacrilato (PMMA). *C. albicans* sorotipo A (NCPF 3153), *C. albicans* Ca2, uma cepa mutante do serotipo A de tubo germinativo deficiente e *C. albicans* UC1, foram utilizadas no estudo. Amostras de saliva não estimulada foram coletada a partir de cinco doadores saudáveis, sendo que estes não haviam tomado qualquer medicação durante os três meses anteriores à pesquisa e não tinham doença periodontal ou cárie ativa. A saliva foi misturada, centrifugada a 6000 g durante 30 min a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a 4°C até sua utilização, caso ocorresse no mesmo dia ou a -80°C até serem utilizadas. Amostras de PMMA (5 x 5 mm) foram confeccionadas, imersas em água destilada por uma semana para eliminação do monômero residual. Em seguida, as amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 20 minutos, lavadas em água destilada estéril e secas. As células da levedura foram inoculadas em meio 199, pH 6,7, e ajustadas a uma concentração final de  $8 \times 10^5$  células/mL e incubadas durante 2 horas a 37°C ou 25°C em placas de cultura de 24 poços contendo os corpos-de-prova de PMMA e 350 µl da suspensão. Após este período, os corpos-de-prova foram removidos das placas, lavados em solução salina estéril e a quantidade de microorganismos aderidos foi quantificada pela contagem do número total de células. O número de células germinadas foi mensurado em 12 campos (0,64 mm<sup>2</sup>). A porcentagem de germinação foi calculada pela seguinte equação: % Germinação = (células germinadas / células totais) x 100. Para determinar o efeito sobre a adesão da película salivar, as amostras foram previamente incubadas em 350 µl de saliva durante 30 min a 37°C. Os resultados confirmaram o papel duplo desempenhado pela saliva, uma vez que a adesão diminuiu as células germinadas, mas aumentou a adesão de

células de levedura no PMMA. Estes efeitos mediados pela saliva não parecem estar relacionados com a inibição da germinação de *C. albicans*, uma vez que níveis similares de filamentação foram observados na presença e ausência de saliva. Estes resultados podem fornecer novas diretrizes sobre o papel conflitante de saliva na adesão de *C. albicans* em resinas acrílicas de base de próteses.

Ainda em 2008, Pereira-Cenci et al.<sup>96</sup> investigaram as interações entre *Candida albicans* e *Candida glabrata* ou *Streptococcus mutans* no crescimento do biofilme em várias superfícies, na presença e na ausência de saliva. Discos de hidroxiapatita (HA), polimetilmetacrilato (PMMA) e reembasador de prótese resiliente (SL) foram utilizados como substratos. Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *S. mutans* PDM1528: um mutante de *S. mutans* UA159 contendo um fragmento de proteína fluorescente verde (GFP) de codificação do gene, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 90030. Para preparar os inóculos, o *S. mutans* foi cultivado anaerobicamente em extrato de levedura Todd-Hewitt (THY) suplementado com 10mg/mL de eritromicina, por 48 horas. *C. albicans* e *C. glabrata* foram cultivadas em condições aeróbias Placas CHROMagar por 24 h. O meio semi-definido modificado (pH 7,0) utilizado neste estudo é constituído por fosfato de potássio, fosfato de nitrogênio, cloreto de sódio, sulfato de magnésio, água e suplementado com vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina HCl, ácido pantotênico, Riboflavina, tiamina HCl e D-biotina), aminoácidos (ácido L-glutâmico, L-arginina HCl, L-cisteína HCl, e de L-triptofano), extrato de levedura, esterilizado por filtração. Este meio foi selecionado pelo seu pH neutro constante, o que favorece o desenvolvimento das hifas. Além disso, o meio permite o crescimento concomitante das espécies e diminui a interferência de fundo na microscopia confocal a laser (MCVL). Subsequentemente, as colônias individuais foram inoculadas separadamente em 10 mL do meio semi-definido para cada microrganismo e incubadas em anaerobiose para *S. mutans* e aerobicamente por espécies de *Candida* em 37°C overnight. A seguir, as células, que se apresentavam na fase de crescimento exponencial tardia, foram lavadas com PBS, ressuspensas em meio de cultura e ajustadas espectrofotometricamente a uma concentração de 10<sup>8</sup> células/ml (0,35 a 600 nm) para as bactérias e 10<sup>7</sup> células/ml para as espécies de *Candida* (0,38 a 520 nm). Os ensaios de biofilme foram realizados com biofilme de uma única espécie de *C. albicans* ou *C. glabrata*, e biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*, *S. mutans* e *C. glabrata* ou *C. albicans* e *C. glabrata*. Discos dos três materiais foram colocados individualmente em cada poço de placa de cultura de

24 orifícios. A seguir, 2 mL de cada suspensão de células foram adicionados a cada poço. Os biofilmes formados foram previamente expostos em saliva por 1 h a 37°C. A saliva humana foi coletada de um único voluntário saudável através de estimulação mastigatória com Parafilm, de forma refrigerada com gelo e então centrifugada 10000 X g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e imediatamente utilizado. Para cada dia experimental, a saliva era coletada no mesmo horário e o volume coletado era de 50 mL. Todos os ensaios do biofilme foram realizados em duplicata em pelo menos quatro ocasiões. Os micro-organismos foram cultivados de forma intacta (sem agitação), durante 24 horas para permitir a formação de biofilme. Adicionalmente, biofilmes foram cultivados para análise em MCVL. A quantidade de micro-organismos viáveis nas camadas do biofilme acumulado foi determinada e convertida para unidades formadoras de colônias por área de superfície (UFC). Além disso, microscopia de varredura confocal a laser foi utilizada para caracterizar os biofilmes e quantificar o número de hifas em cada condição testada. Os resultados obtidos demonstraram que as quantidades de *Candida albicans* e *Candida glabrata* viáveis por mm<sup>2</sup> diminuíram na seguinte ordem: HA > PMMA > SL, independente do açúcar utilizado ou das combinações de biofilmes. A *Candida glabrata* apresentou maiores quantidades de UFC comparada com a *Candida albicans* em todas as condições experimentais. O crescimento de biofilmes em corpos-de-prova cobertos com saliva foi menor, em algumas condições, para a *Candida glabrata* comparado com os corpos-de-prova não cobertos. Entretanto, os biofilmes de *Candida albicans* não foram afetados pela saliva. Ainda, a saliva promoveu a formação de biofilmes menos densos. A glicose e a presença de *Streptococcus mutans* diminuíram a produção de hifas de *Candida albicans*. Os biofilmes de ambas as espécies de *Candida* não apresentaram interações competitivas entre si. O biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans* formado sobre o material resiliente foi composto de duas camadas: uma mais próxima do material consistindo quase que completamente pela bactéria e a segunda, mais afastada da superfície da amostra, isto é, mais externamente, consistindo somente de células de *Candida*. Os autores concluíram que os biofilmes de *Candida* são significativamente afetados pela saliva, tipo de substrato e pela presença de outros micro-organismos.

A finalidade do estudo de Amano et al.<sup>2</sup> (2010) foi determinar se a resistência à escovação de um revestimento de dióxido de titânio sobre um substrato de polimetil metacrilato (PMMA), foi melhorada pelo tratamento prévio com um agente a base de

acriloxipropil trimetoxisilano. Amostras (22 X 23 mm) de uma resina acrílica de base de prótese (Acron GC) foram confeccionadas e então polidas, com a finalidade de se obter uma interface com o verniz de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) melhorada. A seguir, os corpos-de-prova foram submetidos a banho em ultrassom por 10 minutos. A camada de verniz foi depositada por pulverização, com ou sem tratamento prévio com um primer silano e grupados em três grupos experimentais: SP – somente primer silano; TC – somente verniz TiO<sub>2</sub>; SP + TC – primer silano e TiO<sub>2</sub>. As superfícies foram analisadas através de espectrômetro infravermelho (FT-IR) equipado com microscópio, microscopia eletrônica de varredura (SEM), e microanalisador eletrônico de raios X (EPMA). Avaliações transversais foram realizadas para determinar as características superficiais após os tratamentos. A resistência à escovação foi analisada pela escovação das amostras de todos os grupos em máquina de ensaios que simula a escovação mecânica. Foi utilizada escova comercial (Liodebt), sendo que a força de escovação aplicada foi de 300g e a velocidade de escovação foi de 150 ciclos por minutos. Foram realizadas de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  ciclos de escovação para o grupo TC;  $1 \times 10^5$  ou  $2 \times 10^5$  para SP + TC. As alterações de composição foram mensuradas pelo cálculo das proporções atômicas de titânio e carbono (Ti/C). A análise por mapeamento através de EPMA e MEV também foram realizadas após os testes de escovação. As proporções de Ti/C dos grupos TC e SP + TC foram analisadas por análise de variância de 1 fator e a comparação antes e após a escovação foi determinada pelo teste de Bonferroni. A significância utilizada para todas as análises foi de 95%. O tratamento prévio promoveu aumento da resistência à escovação, enquanto que o revestimento de titânio foi removido depois de menos de  $1 \times 10^5$  ciclos de escovação, sem tratamento prévio. Isto sugere que o tratamento prévio com um agente a base de acriloxipropil trimetoxisilano pode conferir uma maior durabilidade contra o stress induzido pela escovação sobre um revestimento de TiO<sub>2</sub> e sua aplicação em próteses de resina acrílica.

Dada a característica de reservatório potencial de infecção dos implantes dentários, especialmente pela contaminação de *Candida albicans* por via oral, Bürgers et al.<sup>13</sup> (2010) avaliaram a adesão fúngica inicial em três tipos de superfície de titânio diferencialmente texturizadas e de uma superfície de implante de zircônia, e correlacionaram essas diferenças de resultados nas características específicas de superfície (rugosidade - Ra e energia livre de superfície - ELS). Além disso, foi investigada também a influência da película salivar e duas proteínas salivares

específicas (mucina e albumina). Discos de 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura dos quatro tipos de superfícies de implantes tiveram sua rugosidade superficial (Ra) aferida. A seguir, o ângulo de contato foi mensurado goniômetro, para a determinação da energia de superfície livre (ESL), utilizando-se três líquidos diferentes: água deionizada, diiodometano e etilenoglicol. Uma amostra de cada grupo foi submetida à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a validação morfológica. Todas as amostras foram incubadas por 30 minutos em Hipoclorito de sódio 1% para prevenir a contaminação microbiana e então esterilizadas antes do uso. Previamente aos testes de adesão fúngica, a formação da película adquirida foi realizada pela incubação das amostras em 1 mL de saliva, PBS, solução mucina ou solução de albumina por 2 horas. Saliva não estimulada foi coletada pela expectoração de um indivíduo saudável sem qualquer atividade de cárie ou doença periodontal. A saliva foi esterilizada por filtração. A seguir, foi realizada a formação do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície das amostras. Para isso, a cepa clínica isolada de *C. albicans* DSMZ 1386 foi incubada overnight em meio fúngico, seguido de centrifugação das células a 1000 g por 5 minutos a 18°C. A suspensão foi ajustada a uma concentração de 0,3 de densidade óptica a 540nm. Os corpos-de-prova foram incubados nesta suspensão celular padrão por 2,5 horas a 37°C. Após este período, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e então transferidas para tubos Falcon e armazenadas a 4°C. Foi adicionado ainda 4 µl de ácido perclorídrico, agitados por 30 segundos em vórtex e 500 µl de bicarbonato de potássio foi adicionado para neutralização. A seguir os tubos foram centrifugados a 7300 g por 5 minutos a 4°C. Cem microlitros desta solução foram transferidos para cada poço de placas de cultura de 96 orifícios e então 100 µl de ATP bioluminescente foi adicionada em cada orifício. A luminescência foi determinada após 5 minutos, sendo que alta luminescência representa elevada adesão de *C. albicans*. Dez amostras de cada material foram usadas para a quantificação por luminescência, duas para controle (sem micro-organismo) e duas foram controle positivo (com micro-organismo e sem morte). A menor quantidade de células fúngicas foi encontrada em amostras jateadas, enquanto que os implantes de zircônia não demonstraram qualquer redução potencial na aderência de *C. albicans*. A influência da ESL do implante fungos parece ser mais importante do que a influência da rugosidade na formação do biofilme de *C. albicans*. A proteína mucina provocou o maior acúmulo

de *C. albicans*. Em contraste, é provável que a albumina esteja envolvida no processo de adesão de *C. albicans*.

A proposta do estudo in vitro de Freitas Fernandes et al.<sup>30</sup> (2010) foi avaliar a eficácia de soluções de limpeza em biofilmes de *Candida*, mono ou dual, formados em resina poliamida. Para isso, amostras (10 mm de diâmetro e 2mm de espessura) foram confeccionadas com resina acrílica polimerizada em micro-ondas (Acron MC) ou com resina poliamida termoplástica (Flexite). A seguir as amostras foram mantidas em água destilada a 37°C por 12 horas para eliminar os monômeros residuais. Posteriormente, os corpos-de-prova foram lixados e polidos para padronizar a rugosidade superficial, a qual foi subsequentemente mensurada em rugosímetro com resolução de 0,01 µm. Três mensurações foram feitas para cada amostra e a média foi calculada. Para ambas as resinas foi padronizada a rugosidade de 0,34 + ou - 0,02 µm. Após a leitura da rugosidade, os corpos-de-prova foram limpos em ultrassom por 20 minutos para remover qualquer contaminante ou artefato da superfície que obteve o ângulo de contato mensurado. Para esta etapa foram selecionados três líquidos: água destilada, formamida e 1-bromonaphthaleno. O ângulo de contato foi mensurado três vezes em cada líquido a 25 + ou - 1°C, e a média foi determinada. A energia de superfície livre (mN.m-1) foi calculada. Culturas fúngicas ATCCs de *C. albicans* e *C. glabrata* foram reativadas de suas culturas originais e incubadas por 24 horas a 37°C. As células foram então lavadas e ressuspensas em YNB suplementados com 100 mM de glicose e padronizadas a uma concentração de 1 a 5 x10<sup>6</sup> células/mL, ajustadas em espectrofotômetro, com uma absorbância de 0,38 a 520 nm. Os biofilmes foram formados por *C. albicans* e *C. glabrata* isoladas e pela combinação destas espécies. Os discos dos dois materiais foram mantidos verticalmente em placas de cultura com 24 orifícios, seguindo-se a introdução de 2 mL de cada suspensão celular (10<sup>6</sup> CFUs *C. albicans* e /ou *C. glabrata* em YNB) nos orifícios. Os biofilmes foram formados sobre películas salivares (incubação em saliva humana filtrada por 30 minutos) dos discos de PMMA e resina poliamida. A área da superfície era de 219,8 mm<sup>2</sup>. Todo o ensaio de biofilme foi realizado em duplicata em pelo menos 4 experimentos independentes em diferentes dias. Os micro-organismos foram desenvolvidos a 37°C a 75 rpm em agitador orbital por 72 horas. Após este período, as amostras foram divididas em 4 grupos separados pelos tratamentos: água destilada – controle negativo; solução enzimática (PD), solução de Corega Tabs (CT) ou solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, que serviu como controle positivo. Antes e após os tratamentos, os corpos-de-

prova foram lavados duas vezes em PBS. Após os tratamentos, os discos foram transferidos para tubos contendo 3 mL de PBS. Os micro-organismos aderidos foram removidos das amostras por sonificação a 7W por 30 segundos. As soluções sonicadas foram diluídas de forma seriada em PBS e 20µl das diluições foram plaqueadas em triplicata em ágar CHROMOagar e Ágar Sangue (usado para verificar possíveis contaminações). As placas foram incubadas a 37°C em ambiente aeróbico por 24-72 horas. As unidades formadoras de colônias foram contadas e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por área. Todos os biofilmes testados apresentaram crescimento na resina poliamida que tinham a menor energia de superfície livre. As soluções de limpeza diminuíram significativamente os níveis de *Candida*; entretanto, a solução de NaOCl foi a única solução eficaz. *C. glabrata* promoveu aumento significativo das unidades formadoras de colônias em todas as condições experimentais. Os autores concluíram que o biofilme de *Candida* spp. formado nas resinas poliamidas se desenvolvem mais que sobre as superfícies de PMMA. As soluções de limpeza são capazes de remover os biofilmes de *Candida* spp. formados em ambas as resinas.

Silva et al.<sup>116</sup> (2010) relataram que a candidose tem sido atribuída a *C. albicans*, embora as infecções causadas por espécies não-*Candida albicans* *Candida* (NCAC) estejam sendo cada vez mais frequentemente identificadas. A capacidade da *Candida* se desenvolver em biofilmes traduz uma característica importante na infecção e persistência no hospedeiro. A atividade em biofilmes é significativa, uma vez que a alta atividade pode ser associada com aumento da expressão de fatores de virulência, enquanto que a baixa atividade foi previamente sugerida como um mecanismo de resistência das células do biofilme aos antimicrobianos. Assim, os autores determinaram a atividade metabólica dos biofilmes formados in vitro por diferentes isolados clínicos de espécies NCAC. A atividade metabólica total in situ de biofilmes de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi determinada utilizando o ensaio de redução XTT, e por contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). A estrutura do biofilme foi avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram que a atividade metabólica total do biofilme é espécie e cepa dependente. *C. glabrata* apresentou a menor atividade metabólica do biofilme apesar de ter o maior número de células cultiváveis no biofilme. Do mesmo modo, a atividade metabólica da *C. glabrata* das células planctônicas foi menor do que as outras espécies. Este estudo demonstrou a existência de diferenças intrínsecas na atividade de

espécies NCAC, o que pode trazer implicações importantes em relação a virulência das espécies. Além disso, houve ausência de correlação evidente entre a quantidade de unidades formadoras de colônias e a atividade metabólica do biofilme, induzindo o questionamento sobre qual parâmetro é o mais adequado para a avaliação *in vitro* de biofilmes e seu significado clínico potencial.

A adesão de *Candida albicans* em superfícies constitui pré-requisito para a ocorrência da estomatite protética. Dessa forma, Zamperini et al.<sup>136</sup> (2010) investigaram se as modificações de superfície com tratamentos a plasma poderia reduzir a adesão de *C. albicans* em uma resina acrílica para base de prótese. Amostras de 13,8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (n = 180) com superfícies lisas e/ou rugosas foram confeccionadas utilizando-se a resina polimerizada por energia de micro-ondas Vipi Wave e tiveram, a seguir, sua rugosidade superficial mensurada por rugosímetro SJ-400 (Mitutoyo), a fim de padronizar a superfície das amostras. Posteriormente, os corpos-de-prova foram divididos em cinco grupos: controle-amostras sem tratamento; grupos experimentais- os corpos-de-prova foram submetidos a tratamentos com plasma com a finalidade de se obter superfícies com diferentes hidrofobicidades (AR/50 W; ArO2/70 W; AAt/130 W) ou incorporação de flúor (Ar/SF670 W). O ângulo de contato foi mensurado em goniômetro, utilizando-se água deionizada como líquido teste, imediatamente após os tratamentos e depois da imersão em água durante 48 h. Adicionalmente, a caracterização da superfície foi realizada por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X. Para cada grupo, metade das amostras foi incubada com saliva antes o ensaio de adesão. A saliva foi coletada de 15 adultos saudáveis, de forma não estimulada e acondicionada no interior de Tubos Falcon de 50 mL, os quais estavam imersos em gelo, com a finalidade de manter a saliva coletada refrigerada. A seguir, a saliva total foi misturada, homogeneizada e centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C e então diluída na proporção de 50% em volume em PBS estéril, sendo armazenada a -70°C até sua utilização. Após a exposição em saliva foi realizado o ensaio de aderência de *C. albicans*. Para isso, *C. albicans* ATCC 90028 foi cultivada de sua cultura original em meio YEPD por 48 horas a 37°C. A seguir duas alçadas desta cultura jovem foram transferidas para Tubos Falcon contendo 20 mL de YNB suplementado com 50 mM de glicose e incubadas por 24 horas a 37°C. As células resultantes após este período foram então lavadas duas vezes em PBS, centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos e ressuspendidas em YNB

suplementado com 100 mM de glicose. A suspensão de *Candida* foi então padronizada espectrofotometricamente a uma concentração de  $1 \times 10^7$  cels/mL e a seguir, 3mL desta suspensão padronizada foi transferida para cada um dos poços de placas de cultura de 12 poços, os quais continha um corpo de prova em cada orifício. As placas foram incubadas por 90 minutos a 37°C para a aderência dos micro-organismos. Controles negativos foram formados por amostras incubadas com meio de cultura sem células. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões distintas. O número de células aderentes de leveduras foi avaliado pelo método de redução do XTT, seguindo o protocolo preconizado por da Silva et al. (2008). Para os grupos experimentais, houve mudança significativa no ângulo de contato após as 48 h de imersão em água. Os grupos ArO2/70W e ArSF6/70W tiveram significativamente menores valores de absorbância comparados com os demais grupos, independente da presença ou ausência de saliva e rugosidade da superfície. Com base nestes aspectos os autores concluíram que os tratamentos a plasma ArO2/70W e ArSF6/70W podem ser considerados promissores na redução da aderência de *C. albicans* em resinas para base de próteses.

O papel da saliva sobre a adesão de *Candida* a biomateriais não é claramente definido. Dessa forma, Zamperini et al.<sup>137</sup> (2010) investigaram se os diferentes períodos de pré-condicionamento com saliva influenciam na adesão de *Candida albicans* a uma resina para base de prótese (Vipi Wave). Noventa amostras de resina acrílica com superfícies lisas foram fabricadas e tiveram sua rugosidade superficial mensurada em rugosímetro e divididas em cinco grupos: um grupo controle sem saliva, e quatro grupos experimentais condicionados em saliva, por períodos de 30 minutos, 1, 3 ou 12 h. A saliva não estimulada foi coletada de 15 indivíduos saudáveis. A saliva foi dispensada em tubos Falcon estéreis de 50 mL, sobre gelo, misturadas e centrifugadas a 10 000 X g durante 5 min a 4°C e então esterilizada por filtração. A saliva resultante foi imediatamente armazenada -70°C até sua utilização. Previamente aos testes microbiológicos, os corpos-de-prova foram mantidos em água destilada em temperatura ambiente durante 48 h a fim de eliminar monômeros residuais. A seguir as amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 20 minutos e seguidas de exposição em luz UV na câmara de fluxo laminar por 20 min para cada lado. Após a esterilização dos corpos-de-prova, estes foram submetidos ao condicionamento em saliva, de acordo com os grupos experimentais propostos. Após a exposição em saliva, *C. albicans* ATCC 90028 foi semeada em meio YEPD e incubada a 37°C durante 48 h.

Duas alçadas desta cultura jovem foram transferidas para 20 mL de meio de cultura YNB suplementada com 50 mM de glicose e incubadas a 37°C durante 21 h. As células resultantes foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS a 5000 X g durante 5 minutos, e ressuspensas em YNB suplementada com 100 mM de glicose. As suspensões de *Candida* suspensões foram ajustadas a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL, por espectrofotometria. A seguir 3 mL da suspensão celular padrão foi transferida para cada poço contendo um corpo de prova em cada orifício e então as células foram incubadas por 90 minutos a 37°C. As células não aderidas foram removidas da amostra pela lavagem suave (duas vezes) com 3 mL de PBS. Controles negativos eram amostras de sem células e somente com o meio de cultura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões independentes. A adesão de *Candida* foi avaliada por coloração com violeta de cristal e pelo ensaio de XTT. A análise de variância de um fator revelou que não houve diferenças significativas entre o número células aderidas ou nos valores de absorvância. Não foi encontrada correlação significativa entre os dois métodos utilizados para avaliar a adesão de *Candida albicans*. Dessa forma, os autores concluíram que os diferentes períodos de pré-condicionamento com saliva não influenciaram significativamente na adesão de *Candida albicans* em resinas acrílicas.

O plasma sanguíneo humano e soro representam desafios significativos para a compatibilidade de cateteres devido à adsorção altamente desfavorável e não específica das proteínas sobre a superfície. Dessa forma, Zhao et al.<sup>141</sup> (2010) avaliaram a efetividade de um método de duas etapas para imobilizar iniciadores do tipo tióis sobre um substrato de ouro para a polimerização iniciada por transferência dos radicais atômicos (SI-PRTA) de um hidroxipropil metacrilato (HPMA). A adsorção de proteínas foi obtida a partir de uma única solução proteica, diluída (10%) e não diluída (100%) do plasma de sanguíneo humano, soro e o preenchimento da superfície com diferentes espessuras de películas de HPMA usando sensores de ressonância de superfície plasmática (SPR). Os resultados obtidos pelo SPR mostraram uma correlação entre as propriedades anti-incrustantes com a espessura do filme, isto é, filmes de HPMA exibem alta resistência à proteína em espessuras médias de 25-40 nm. Os autores concluíram que o revestimento com HPMA constitui uma importante ferramenta no controle da adsorção de proteínas sobre as superfícies dos biomateriais, especialmente aquelas em contato com o sangue humano.

O objetivo do estudo de Chen et al.<sup>19</sup> (2011) foi avaliar a eficácia antimicrobiana do tradicional *Fructus mume* da Medicina Chinesa em um modelo de biofilme monoespécies em bráquetes ortodônticos in vitro. O efeito antimicrobiano do extrato aquoso *Fructus mume* em células planctônicas de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) foi avaliada pelo método da microdiluição (MIC). A viabilidade celular de *S. mutans* no biofilme do bráquete Damon3 MX, depois de expostos a ao extrato *Fructus mume* foi quantificado por ensaio de redução de XTT. A visualização das amostras foi realizada por microscópio de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Ainda, foi realizada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) no extrato *Fructus mume*. A análise de HPLC revelou que os principais compostos de *Fructus sp.* são ácidos orgânicos. O MIC do extrato *Fructus mume* nas células planctônicas de *S. mutans* foi de 50 mg/mL. Os valores de densidade óptica (DO), medido pelo ensaio de redução de XTT, demonstraram que a viabilidade das células do biofilme de *S. mutans* expostos a 250 mg/mL do extrato de *Fructus sp.* foi reduzida ( $p < 0,01$ ). As imagens de microscopia mostraram que o extrato de *Fructus mume* obviamente aumentou a quantidade de bactérias mortas na superfície do substrato. Dessa forma, os autores concluíram que o extrato de *Fructus mume* apresentou efeito antimicrobiano no biofilme de *S. mutans* em bráquetes ortodônticos in vitro, o que pode indicar a sua potencial utilização como agente antimicrobiano oral para pacientes ortodônticos.

No mesmo ano, o estudo de Cruz et al.<sup>24</sup> avaliou a eficácia da remoção completa de biofilme em próteses através da utilização de produtos químicos (comprimidos de peróxido alcalino efervescente- Corega Tabs®), de método mecânico (ultrassom) e métodos combinados (associação de comprimidos efervescente e ultrassom). Usuários de próteses totais participaram do experimento cuja duração foi de 21 dias. Estes foram distribuídos em quatro grupos ( $n = 20$ ): G1- Escovação das próteses com água (controle); G2- comprimidos efervescentes (Corega Tabs®), G3- uso do dispositivo ultrassônico e G4- associação de comprimidos efervescentes e do dispositivo de ultrassom. Todos os indivíduos foram orientados a escovar as próteses com escova e água, três vezes ao dia, antes de aplicarem os seus tratamentos. O biofilme das próteses foi coletado inicialmente e após 21 dias. Para quantificar o biofilme, as superfícies internas das próteses totais superiores foram coradas e fotografadas a 45°. As fotos foram processadas e as áreas (superfície interna total corada com biofilme) quantificadas através de um software de processamento de

imagens. A porcentagem do biofilme foi calculada pela relação entre a área de biofilme multiplicada por 100 e a área total da superfície interna da prótese total superior. Os métodos experimentais foram igualmente eficazes em relação à capacidade de remoção do biofilme e foram superiores ao método controle (escovação com água). Segundo os autores, a imersão em peróxido alcalino e vibração ultrassônica podem ser usadas como agentes auxiliares para a limpeza de próteses totais.

O objetivo do estudo de Gobor et al.<sup>39</sup> (2011) foi incrementar a robustez do sinal colorimétrico em relação ao conteúdo da célula aeróbica e anaeróbica de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Para isso, avaliou-se a utilização de D-glutamina, um substrato tricarboxílico anapleurótico de ciclo ácidos (ATC), na resposta do metabolismo aeróbio e anaeróbio, comparando com um protocolo clássico de redução de XTT. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Candida albicans* SC5314 foram cultivadas aerobicamente em BHI, para as bactérias, e YPD para a levedura, em agitador orbital (120 rpm) a 37°C. Aliquotas (100 µl) das suspensões celulares padrão ( $1 \times 10^8$  cels/mL para as bactérias e  $1 \times 10^7$  cels/mL para a *C. albicans*) foram então incubadas em condições de anoxia (90% de N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>) em agitador orbital (120 rpm) a 37°C. A seguir, 100 µl de L-asparagina 0,1% estéril foram dispensadas em poços de placas de cultura de células de 96 orifícios e incubadas aerobicamente e estaticamente a 37°C durante 2 h. Os poços foram lavados duas vezes com NaCl 145 mM estéril. Posteriormente, em cada poço, 100 µl das células de bactéria anoxia ( $1 \times 10^8$  cels/mL) e da levedura ( $1 \times 10^7$  cels/mL) foram dispensados em cada poço. As placas foram incubadas em anoxia (90% de N<sub>2</sub>, mais de 10% de CO<sub>2</sub>), em agitador orbital (100 rpm) durante 3 h a 37°C. Após este período, os poços foram lavados sucessivamente com NaCl 145 mM para remover as células não aderidas. Novamente foram colocados 100 µl do meio de cultura adequado (BHI para bactérias e Sabouraud para levedura) em cada poço e as placas voltaram para as condições de anoxia por mais 48 h. No grupo controle, os poços receberam a L-asparagina e BHI ou Sabouraud sem as células microbianas. A quantificação celular foi realizada por Coloração Cristal Violeta; ensaio de redução do XTT (protocolo clássico – solução XTT, menadiona e PBS); XTT com glicose (segundo da Silva et al., 2008), no qual é adicionado a

formulação clássica do XTT 100mM de glicose; XTT com glutamina, onde é adicionado a formulação clássica do XTT 50 mM, 100 mM ou 200 mM de glutamina. Ainda, foi realizado o ensaio de XTT para o biofilme suspenso após a realização dos ensaios anteriores. Verificou-se que a avaliação da arquitetura do biofilme suspenso não foi favorecida pelo ensaio de XTT para qualquer dos micro-organismos utilizados. A utilização da glutamina a 50 mM (para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*) e a 25 mM (para *C. albicans* e *S. mutans*) podem aumentar a detecção do formaram solúvel de forma significativa, tornando assim o ensaio de XTT mais robusto.

Izumida et al.<sup>55</sup> (2011) avaliaram o efeito de desinfecções sucessivas por energia de micro-ondas sobre a rugosidade superficial de três resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese após ensaio de escovação. A desinfecção por energia de micro-ondas tem sido recomendada para reduzir a contaminação cruzada. No entanto, este procedimento pode também influenciar as propriedades físicas e mecânicas de resinas acrílicas. Dessa forma, amostras (40 X 20 X 2 mm) das resinas Lucitone 550 (L), QC 20 (QC) e Acron MC (A) foram preparadas e divididas em quatro grupos (n = 10): Controles 1 (C1) e 2 (C2) - armazenados em água durante 48 horas ou 7 dias, Grupos experimentais 1 (MW2) e 2 (MW7) - armazenados em água durante 48 h e desinfetados (650 W durante 6 min) por dia, durante 2 ou 7 dias, respectivamente. Após os tratamentos, as amostras foram colocadas numa máquina de escovação, com velocidade de 60 ciclos por minuto, utilizando-se escovas de cerdas duras (Tek dura) e dentifrício com alta quantidade de abrasivos (Colgate bicarbonato de sódio). Os corpos-de-prova foram submetidos a 20.000 ciclos de escovação, correspondentes a cerca de 2 anos de higienização. A rugosidade superficial (Ra) foi avaliada antes e depois do ensaio de escovação. Os resultados revelaram alterações significativas entre os grupos teste para as resinas A e L. A comparação entre as resinas revelaram que para MW7, a rugosidade de A foi significativamente menor do que a de L. Após sete ciclos de desinfecção por energia de micro-ondas, os valores de rugosidade de QC foram significativamente inferiores do que os de L. Assim, a rugosidade de QC após a escovação não foi significativamente afetada pela desinfecção por micro-ondas. Para A e L, sete ciclos de micro-ondas resultou em aumento da rugosidade.

As alterações superficiais de resinas acrílicas também foi o objetivo do estudo de Mainieri et al.<sup>75</sup> (2011). Os autores avaliaram as alterações de superfície de

reembasadores resilientes, com ou sem a proteção superficial com selantes, seguida de abrasão por escovação mecânica. Para isso, trinta amostras do reembasador resiliente (Coe-Soft), a base de metacrilato e um material a base de siloxano (Ufi-Gel SC) foram confeccionadas (2 X 20 mm) e metade delas recebeu duas camadas de selante superficial. As amostras foram submetidas a um ensaio de escovação mecânica com solução de dentifrício (Kolynos), usando 200 g de força e realizando 250 ciclos/min. A escovação mecânica foi simulada por período de 1 mês (1250 ciclos) e 6 meses (5000 ciclos). A rugosidade superficial (parâmetro Ra) foi mensurada em rugosímetro digital (SJ-201 Mitutoyo) e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas. Os dados de rugosidade superficial foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguidos pelo teste de Bonferroni (alfa = 0,05). Os resultados demonstraram que a rugosidade superficial aumentou após 6 meses de escovação, independente do revestimento com selante. Inicialmente, apenas o Coe-Soft sem selante apresentou maior rugosidade do que os outros grupos. Após 1 mês, a rugosidade do Coe-Soft com selante foi três vezes maior do que no início do estudo, sendo que os demais grupos não apresentaram aumento significativo de rugosidade. A microscopia eletrônica de varredura mostrou degradação dos selantes ao longo do tempo, exceto para Ufi-Gel SC com selante, que exibiu mínima alteração da superfície. Segundo os autores, o revestimento dos reembasadores resilientes poderia favorecer sua resistência a degradação devido ao contato com a saliva, alimentos, soluções desinfetantes e escovação mecânica, além de preencher porosidades e irregularidades da superfície, tornando mais fácil a remoção do biofilme aderido. Os autores concluíram que o revestimento com selante reduziu a degradação da superfície dos reembasadores resilientes testados, mas o efeito protetor mais pronunciado ocorreu para o material a base de siloxano.

Um estudo clínico randomizado foi realizado por Moffa et al.<sup>81</sup>, também em 2011, para avaliar o efeito da desinfecção química com perborato de sódio (Corega Tabs) ou solução de digluconato de clorexidina 2% na estabilidade de cor de um reembasador rígido (Tokuyama Rebase Fast II) durante seis meses. Após as medições de cor iniciais, os pacientes foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: Grupo controle - escovação com sabão de coco e escova de dente macia; grupo perborato - escovação de acordo com os métodos anteriores e desinfecção com solução aquecida de perborato de sódio (Corega Tabs) por 5 min uma vez por dia, e grupo clorexidina - escovação de acordo com o grupo controle e desinfecção com digluconato de

clorexidina a 2% durante 5 minutos, uma vez por dia. Observaram-se alterações em alguns parâmetros de cor da resina Tokuyama Rebase quando as próteses foram desinfetadas por perborato de sódio e solução de digluconato de clorexidina 2%. A estabilidade de cor também foi influenciada pelo tempo, independente se houve ou não desinfecção. Segundo os autores, a estabilidade de cor dos materiais dentários é uma variável a ser considerada na escolha dos métodos de desinfecção.

Ainda sobre a estomatite protética, Silva et al.<sup>117</sup> (2011) relataram que a maioria dos casos de candidose tem sido atribuída a *Candida albicans*, mas, recentemente, as espécies não-*C. albicans Candida* (NCAC) foram identificadas como patógenos humanos frequentes. A patogenicidade da *Candida* tem sido atribuída a vários fatores, incluindo a adesão em dispositivos médicos e/ou células hospedeiras, a formação de biofilme e secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemólise). Apesar das novas espécies *Candida* estarem emergindo, ainda há falta de informação sobre a sua patogenicidade. Esta revisão discutiu os recentes avanços no conhecimento de *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, bem como seus fatores de virulência, especialmente aqueles relacionados à adesão e formação de biofilme, principais componentes da patogenicidade de *Candida*. Por muitos anos a *C. glabrata* foi considerada uma saprófita não-patogênica da flora normal de indivíduos saudáveis e não era associada a qualquer infecção séria. Entretanto, ela pode se disseminar rapidamente ao longo do corpo e sua infecção pode apresentar uma elevada taxa de mortalidade. Além disso, a *C. glabrata* apresenta resistência a certos agentes antifúngicos. A *Candida parapsilosis* é considerada uma das espécies menos virulentas, embora seja atualmente frequente causa de candidemia, comumente associada a pobre higienização bucal. Já a *Candida tropicalis* vem sendo considerada o segundo ou terceiro agente da candidemia, especialmente em pacientes oncológicos e é frequentemente associada com infecções do trato urinário. O aumento na determinação das espécies NCAC na candidose humana pode ser devido em parte pelo avanço nos métodos diagnósticos, como a utilização de meios de cultura capazes de diferenciar as diferentes espécies e a introdução das técnicas de diagnóstico moleculares. Ainda, devem ser considerados outros fatores no aumento da prevalência de espécies de *Candida*, tais como o uso de certas práticas médicas como a terapia imunossupressora, o uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro, o aumento de procedimentos cirúrgicos invasivos, como transplantes de órgãos. Além disso, a seleção das espécies na presença de certos antifúngicos, tornando-as resistentes,

também é reflexo deste aumento das espécies NCAC. A patogênese da candidose invasiva pode ser facilitada por vários fatores, incluindo a capacidade de aderir a dispositivos médicos e/ou células hospedeiras e formar biofilmes. Também é importante ressaltar a capacidade de algumas espécies de *Candida* em alterar suas formas de crescimento de leveduras para formas filamentosas, aumentando sua capacidade de invadir tecidos do hospedeiro. *C. albicans* é um verdadeiro organismo polimórfico, capaz de crescer como hifas e/ou pseudo-hifas e como blastósporos (levedura); a *C. tropicalis* produz blastósporos ovais, pseudo-hifas, e, de acordo com alguns relatos, hifas verdadeiras; a *C. parapsilosis*, produz predominantemente blastósporos, embora esta espécie possa produzir pseudo-hifas, mas não produza hifas verdadeiras; a *C. glabrata* não é polimórfica, crescendo apenas como blastósporos. A primeira fase da infecção por *Candida* é a sua aderência ao substrato, muitas vezes levando a formação de biofilmes. Assim, a aderência é um passo muito importante no processo de infecção, e o grau de adesão é dependente do micro-organismo, do hospedeiro e das propriedades superficiais da célula, tais como a hidrofobicidade superficial e a composição da parede celular. A parede celular da levedura é o local das interações físico-químicas entre as superfícies do micro-organismo e do substrato, levando a sua adesão. A superfície celular da *C. glabrata* exibe um grau de hidrofobicidade comparável com a da *C. albicans*, no entanto, estes resultados foram obtidos a partir do estudo de um número limitado de cepas de *C. glabrata*. Curiosamente, enquanto a hidrofobicidade da *C. albicans* parece ser extremamente sensível a condições de crescimento específicas, a hidrofobicidade superficial de numerosos isolados de *C. glabrata*, foram estáveis sob as mesmas condições de crescimento. Além disso a *C. glabrata*, também pode apresentar tendência duas vezes maior para se aderir a superfícies acrílicas de próteses dentárias em comparação com a *C. albicans*. Um fator importante que tem correlação com a capacidade de adesão das espécies de *Candida* é a presença de proteínas específicas da parede celular, como as adesinas, sendo que as adesinas da *C. glabrata* foram consideradas importantes na adesão ao epitélio humano e na formação de biofilme. A patogênese da candidose da mucosa tem sido investigada, principalmente, usando modelos animais, e mais recentemente, epitélio humano reconstituído (EHR), o qual foi utilizado com sucesso no estudo da invasão in vitro por espécies de *Candida*. Neste modelo, a *C. parapsilosis* apresentou uma alta capacidade de colonizar o EHR, apesar de uma menor capacidade de invadir este tecido. Ainda a *C. tropicalis* apresentou capacidade para colonizar e

invadir EHR de forma semelhante a *C. albicans*, enquanto que a *C. glabrata* não foi invasiva neste modelo. Portanto, dada a impossibilidade da *C. glabrata* em gerar formas filamentosas, pode-se concluir que a forma filamentosa é importante para a invasão do tecido hospedeiro. No que diz respeito a formação de biofilme, após a fixação inicial de *Candida* ao substrato ocorre a divisão celular, e subsequente proliferação e desenvolvimento do biofilme. Biofilmes são associados a comunidades de micro-organismos envolvidos a uma matriz extracelular (MEC), e são considerados a forma mais prevalente de seu crescimento. A formação de biofilme é um fator de virulência potente para um número de espécies de *Candida*, conferindo tolerância significativa a terapia antifúngica, principalmente pela limitação da penetração de substâncias através da matriz do biofilme. O crescimento como biofilme também serve para proteger as células às respostas imunitárias do hospedeiro. Além disso, os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são hábeis em formar biofilmes, e sua presença durante a infecção tem sido associada a maiores taxas de mortalidade em comparação com os isolados incapazes de formar biofilmes. Acredita-se que a formação de biofilmes maduros e subsequente produção da MEC é fortemente dependente da espécie, cepa, e das condições ambientais, tais como o pH, composição do meio e taxa de oxigênio. Em geral, a formação do biofilme de *C. albicans* está relacionada com o dimorfismo alternado entre levedura e hifas, e biofilmes de esta espécie tem geralmente duas camadas distintas: uma fina basal camada de levedura e uma camada de hifas mais espessas, menos compacta. A genética do biofilme de *C. glabrata* mutantes identificou quatro genes envolvidos na formação e condições de crescimento de biofilme. Ainda, os biofilmes de *C. glabrata* apresentam uma estrutura mais compacta do que os de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Deve ser ressaltado que as comparações entre estes biofilmes deve sempre considerar as diferenças fisiológicas inerentes entre estas espécies, tais como o tamanho relativo da célula, morfologia e bioquímica. A formação do biofilme e composição da matriz são fortemente dependes das cepas e das condições ambientais (composição do meio, pH e oxigênio). A matriz do biofilme de *C. albicans* é composta principalmente de hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas, enquanto que a matriz de *C. glabrata* contém elevados níveis de proteínas e hidratos de carbono.

Dada a propensão da aderência fúngica ao polimetilmetacrilato (PMMA) Zamperini et al.<sup>138</sup> (2011) investigaram a redução de *C. albicans* em superfícies modificadas por tratamentos com plasma. Para isso, amostras (n = 180) de uma resina

acrílica polimerizada por energia de micro-ondas foram confeccionadas, com superfícies lisas e rugosas e então divididas em cinco grupos: controle - não tratados; grupos experimentais - submetidos a tratamentos com plasma visando obter superfícies com diferentes hidrofobicidades (Ar/50 W; ArO<sub>2</sub>/70 W; AAt/130 W), ou com flúor incorporado (AR/SF670 W). O ângulo de contato foi mensurado imediatamente após os tratamentos. A seguir, as amostras foram imersas em água por 48 h. Para cada grupo experimental, metade das amostras foi incubada com saliva antes do teste de aderência. O número de células de *C. albicans* aderida foi avaliado pela coloração cristal violeta. Os tratamentos a plasma foram eficazes em alterar a superfície de PMMA. No entanto, houve uma alteração significativa no ângulo de contato após a imersão em água. Não houve diferença estatisticamente significativa na adesão de *C. albicans* entre os grupos controle e experimentais, independente da presença ou ausência de saliva ou da rugosidade da superfície.

Brusca et al.<sup>9</sup> (2012) avaliaram os mecanismos de interação entre os patógenos orais *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, através da cinética de crescimento para os dois micro-organismos, cultivados individualmente ou em conjunto, durante 36 h. Culturas individuais de *C. albicans* (ATCC 10231) e *S. mutans* (ATCC 35668) ou de ambos os micro-organismos foram estudadas. Para as colônias individuais de *C. albicans*, estas foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose e incubadas, em condições aeróbicas a 37°C por 18 h. Do mesmo modo, o *S. mutans* foi semeado em ágar Todd-Hewitt em condições micro-anaeróbicas a 37°C por 24 h. Em seguida, as colônias individuais de cada micro-organismo foram ressuspensas em meios líquidos, compostos de Sabouraud caldo, Todd Hewitt caldo e meio basal (tripticase, NaCl, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>POH, KPOH<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, pH = 7) por 5 horas. Para as curvas de crescimento experimentais, amostras de cada micro-organismo na fase de crescimento exponencial foram obtidas, quantificados e ajustados espectrofotometricamente. As curvas de crescimento foram realizadas a 37°C, sem agitação. Não foram observadas mudanças no pH (pH = 7) durante o período. Colônias de *C. albicans* e de *S. mutans* apresentam diferentes fenótipos e foram quantificadas por microscopia, pela observação de colônias aderidas ao fundo dos frascos e por coloração de Gram e Rapid ID 32 Strep e API 20 AUX C para confirmar a identidade das unidades formadoras de colônia (UFC), durante as curvas de crescimento. O crescimento foi monitorado em intervalos regulares durante 24 horas e a mensuração final foi realizada após 36 h para confirmar se o estado estacionário foi atingido. Todas as curvas de crescimento foram

realizadas em triplicata. As curvas de crescimento foram analisadas por meio de modelo matemático. Sob as condições experimentais deste estudo, a concentração final de *S. mutans*, quando cultivados individualmente, foi 5 vezes maior do que a concentração final de *C. albicans*. Contrariamente, quando ambos os microorganismos cresceram juntos, esta razão foi invertida e a concentração final da *C. albicans* foi ainda mais elevada do que a de *S. mutans*. Quando ambos os microorganismos são partes do nicho, um modelo incluindo a concorrência linear entre um e outro é mais adequado para reproduzir as observações experimentais. Os resultados deste modelo mostraram que as taxas de crescimento iniciais de ambas as espécies são positivamente influenciadas pela sua interação mútua. No entanto, em tempos de incubação mais longos, a *C. albicans* impede o crescimento bacteriano e atinge concentrações 4 vezes mais elevadas do que quando são cultivados individualmente. Os resultados deste estudo sugerem que a formação de biofilme de *C. albicans* pode ser potencializada pela presença de *S. mutans* por dois mecanismos: sinergicamente por curtos períodos e pela concorrência em períodos mais longos.

Biofilmes de *C. albicans* também foram o alvo do estudo de Cochis et al.<sup>22</sup> (2012). Os autores avaliaram in vitro a atividade antiaderente de biosurfactantes contra biofilmes de *Candida albicans*. Discos de material resiliente a base de silicone e resina acrílica para base de próteses foram pré-revestidos com concentrações crescentes de biosurfactantes obtidos a partir de biofilmes endófitos selecionados de *Robinia pseudoacacia* e de *Nerium oleander*, e depois contaminados com células de *C. albicans*. O número de células do biofilme foi determinado pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de XTT, e a citotoxicidade foi avaliada pelo teste de MTT. Solução de clorexidina foi utilizada como controle. O revestimento com biosurfactantes promoveu uma maior redução ( $P < 0,01$ ) no número de células do biofilme e na viabilidade comparada com a clorexidina. A atividade dos biosurfactantes em baixas concentrações (78,12 ng / mL e 156,12 mg / mL) não foi citotóxica. Dessa forma, a conclusão do estudo foi que os biosurfactantes foram efetivos na adesão preventiva de biofilme de *C. albicans*. Os agentes foram considerados anfifílicos, interferindo na aderência microbiana, e demonstraram compatibilidade em células epiteliais e de fibroblastos.

Com o objetivo de avaliar a eficácia da remoção completa do biofilme formado sobre próteses usando solução de clorexidina em duas concentrações: 0,12% e 2%, de

Andrade et al.<sup>29</sup> (2012), selecionaram sessenta usuários de próteses totais que foram distribuídos em três grupos: G1- Controle (imersão em água diariamente durante a noite), G2- imersão uma vez por dia em clorexidina 0,12% por 20 minutos após o jantar e G3- imersão uma única vez em solução de clorexidina 2%, durante 5 minutos. A porcentagem de biofilme foi quantificada na superfície interna de próteses totais superiores no início do estudo e após 21 dias. As superfícies internas das próteses totais superiores foram reveladas com 1% de solução de vermelho neutro. As superfícies foram fotografadas com uma câmera digital e flash. A área total e áreas correspondentes às regiões manchadas foram medidas usando um software de processamento de imagem. A porcentagem de biofilme foi calculada usando a razão entre a área do biofilme multiplicada por 100 e área de superfície total da parte interna da base da prótese. Após o uso de cada método e após sua quantificação, o biofilme foi eliminado pela escovação com uma escova específica para próteses totais e sabonete líquido. Ambos os tratamentos à base de clorexidina tinham uma capacidade similar para remover o biofilme das próteses. Os autores concluíram que a imersão em soluções de clorexidina de 0,12% ou 2% pode ser utilizada como um método auxiliar para a limpeza de próteses totais, pois nenhum efeito adverso ou manchas foram observados após a utilização de qualquer dos tratamentos, tal como observado através de exames clínicos.

Ibarra-Trujillo et al.<sup>52</sup> (2012) quantificaram a produção de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* para determinar se esses biofilmes mistos tem efeitos sinérgicos. Dois isolados clínicos de *C. albicans* e um de *S. aureus*, obtidos a partir de um paciente com mucosite recorrente difícil de tratar foram usados neste estudo. Adicionalmente, cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e *S. aureus* ATCC 25923 foram englobadas no desenho experimental. Os isolados de *C. albicans*, foram incubados em Sabouraud dextrose agar por 24 horas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , enquanto os isolados de *S. aureus* foram cultivados em meio Manitol sob as mesmas condições de crescimento. A seguir uma porção destas culturas foi transferida para tubos Falcon contendo 10 mL de caldo YDP para *C. albicans* e com 10 mL de TSB para *S. aureus*, e incubou-se durante a noite a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com agitação orbital (100 rpm). Subsequentemente, cada inóculo foi centrifugado, lavado três vezes com PBS e novamente suspensos em meio RPMI. Os inóculos foram ajustados para uma densidade de  $1$  a  $5 \times 10^6$  células de levedura/mL e de  $1$  a  $5 \times 10^8$  bactérias/mL utilizando uma câmara de Neubauer. Os biofilmes de cada espécie individualmente e

com um inóculo misto foram formados e avaliados aos 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 h de incubação. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células não aderidas foram removidas por uma série de 3 lavagens com PBS para posterior quantificação dos micro-organismos através da redução enzimática de um sal de tetrazólio (XTT) e as alterações colorimétricas foram medidas a 490 nm. A microscopia confocal de varredura a laser foi usada para visualizar os biofilmes de cada micro-organismo e a sua cinética de crescimento. Os maiores níveis de formação de biofilme foram observados em biofilmes mistos, seguido pelos biofilmes de *Candida albicans*, e os menores níveis de formação do biofilme foram detectados para o *Staphylococcus aureus*. Estes resultados sugerem uma relação sinérgica entre os microrganismos testados.

Muitas moléstias dentais são atribuídas a biofilmes. A avaliação de substâncias antimicrobianas, particularmente, necessita de um número elevado de amostras e, para se obter um modelo realista, a avaliação deve ser o mais rápido e simples possível. Dessa forma, o objetivo do estudo de Koban et al.<sup>58</sup> (2012) foi avaliar a influência do ensaio colorimétrico de XTT em biofilmes *ex vivo* com saliva e a eficácia da clorexidina nestes biofilmes. Para isso, sobre a superfície de discos de titânio estéreis foram formados biofilmes obtidos a partir da saliva coletada de indivíduos saudáveis. A seguir os discos foram expostos a soluções de clorexidina 0,1% e 0,5% por 1 minuto. Tratamento por ozônio também foi realizado para avaliar a remoção do biofilme. A quantidade de células aderidas foi mensurada pelo teste de XTT, unidades formadoras de colônias, microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que o método de XTT pode ser utilizado para mensurar a viabilidade dos micro-organismos em biofilmes obtidos a partir da saliva. O efeito antibacteriano, após o tratamento com a clorexidina ou ozônio, mensurada pelo ensaio de XTT demonstrou que o biofilme foi significativamente reduzido. A eficácia antimicrobiana da clorexidina 0,5% e 0,1% foi semelhante com o tratamento com ozônio. Os autores concluíram que o ensaio XTT é um método adequado para determinar a viabilidade em biofilmes saliva, permitindo a avaliação da eficácia antimicrobiana de substâncias.

O objetivo do estudo de Lazarin et al.<sup>69</sup> (2012) foi avaliar se vernizes fotopolimerizáveis experimentais contendo monômeros zwitteriônicos ou hidrofílicos são capazes de reduzir a adesão de *C. albicans* em uma resina acrílica. Para isso, amostras cilíndricas de 13mm de diâmetro e 2 mm de espessura (n=468), de uma

resina acrílica polimerizada em micro-ondas (Vipi Wave) foram fabricadas com superfícies rugosas ou lisas, a fim de simular tanto a parte interna como externa de próteses removíveis. Após a confecção das amostras, a rugosidade superficial das mesmas foi aferida por rugosímetro digital (SJ-400 Mitutoyo). Foram realizadas quatro mensurações em cada espécime e o valor de Ra obtido foi a média destas mensurações. Em seguida, os corpos-de-prova foram divididos em 13 grupos com 36 amostras em cada grupo, sendo 18 lisos e 18 rugosos. Para o grupo controle, as amostras não receberam qualquer tratamento. Para os grupos experimentais, um dos quatro tipos de vernizes experimentais (2- hidroxietil metacrilato - HE; 3-hidroxipropil metacrilato - HP; 2- trimetilamônio metacrilato clorídrico - T; metacrilato de sulfobetaina - S) foram utilizados. As concentrações dos monômeros constituintes foram 25, 30 ou 35%, culminando em 12 vernizes experimentais (HE25; HE30; HE35, HP25, HP30, HP35, T25, T30, T35, T25; S30, S35). Além dos monômeros citados, todos os vernizes ainda eram constituídos de monômero metacrilato de metila, dois agentes de ligação (trietileno dimetacrilato - TEGDMA e bisfenol-A-glicidil metacrilato - Bis-GMA) e um agente iniciador (4-metil benzofenona). No verniz S, aminopropil metacrilato foi também adicionado. A aplicação dos 12 vernizes nas superfícies das amostras foi realizada em uma câmara de fluxo laminar estéril, seguida de polimerização por 4 minutos em cada superfície de um forno EDG Strobolux. Para o verniz S, propano sultone foi aplicado na superfície das amostras, e então estas foram mantidas numa estufa a 80°C durante 2 h. Posteriormente, todas as amostras foram armazenadas individualmente em sacos plásticos devidamente rotulados contendo água destilada estéril durante 48 horas em temperatura ambiente para liberação de monômeros residuais. Os ângulos de contato das amostras foram mensurados com água. Metade das amostras de cada grupo experimental foi exposta em saliva, a qual foi coletada a partir de 50 adultos saudáveis. Dez mililitros de saliva de cada doador foram misturados, homogeneizados e centrifugados por 5000 X g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante de saliva foi diluído em PBS estéril na proporção de 50% (vol/vol) e então imediatamente armazenado a -70°C até sua utilização. As amostras foram incubadas na solução de saliva em temperatura ambiente durante 30 min. *C. albicans* ATCC 90028 foi cultivada em meio YEPD 37°C durante 48 h. Uma alça desta cultura jovem foi transferida para tubos Falcon contendo 20 ml de YNB suplementado com 50 mM de glicose e incubados a 37°C durante 21 h. Células da cultura resultante foram centrifugadas a 5000 g durante 5 min

e lavadas duas vezes com PBS. A seguir, as células foram ressuspensas em YNB suplementado com 100 mM de glicose. As suspensões de *Candida* foram padronizadas espectrofotometricamente a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL. Três mililitros da suspensão padronizada foram adicionados a cada poço de placas de cultura de 12 orifícios contendo uma amostra em cada orifício. A suspensão foi mantida por 90 min a 37°C para permitir a adesão. A seguir, as células não aderidas foram removidas da amostra através da lavagem cuidadosa por duas vezes com 3mL de PBS. Os controles negativos foram amostras estéreis imersas em caldo YNB suplementado com glicose a 100 mM, sem células. Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata em três ocasiões distintas. As células da levedura aderidas foram quantificadas pela coloração cristal violeta. Ainda, a caracterização das superfícies recobertas pelos vernizes experimentais foi confirmada pela espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Para as amostras lisas, os grupos S35, HP35 e HE35 apresentaram, significativamente, menor número de *Candida* aderida comparadas com o controle, na ausência de saliva. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e o controle para as amostras rugosas, mas a saliva diminuiu o número de células para grupos S25, S30 e HP30. A análise por espectroscopia de fotoelétrons (XPS) confirmou as alterações na composição química das amostras experimentais. Os autores concluíram que os vernizes fotopolimerizáveis experimentais alteraram a composição química e promoveram diminuição da aderência de *C. albicans* nos grupos S35, HP35 e HE35, sugerindo que eles devem ser ainda investigados.

A adesão de *Candida albicans* às superfícies é o primeiro passo para o desenvolvimento da estomatite protética. Uma adequada higienização é essencial para prevenir a formação de biofilme microbiano e o início desta infecção. Desta forma, o objetivo do estudo de Pellizzaro et al.<sup>94</sup> (2012) foi avaliar a efetividade da escovação com diferentes soluções na eliminação de biofilme de *C. albicans*. Para isso, discos de resina acrílica foram confeccionados, esterilizados e inoculados com uma suspensão de  $10^7$  células/mL de *C. albicans*. Após incubação (37°C/48 h), os espécimes foram aleatoriamente divididos em 10 grupos experimentais (n=9): 5 submetidos à escovação com água ou agentes de limpeza (dentifrício, digluconato de clorexidina (CHX) a 2%, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% e Polident fresh cleanse®) e 4 apenas imersos nos agentes de limpeza. Espécimes não submetidos à higienização foram utilizados como controle positivo. A viabilidade celular foi verificada pelo teste de redução do XTT. Os resultados obtidos foram analisados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-

Wallis ( $\alpha=0,05$ ). A escovação com todos os agentes de limpeza apresentou redução significativamente superior ( $p<0,0001$ ) na viabilidade do biofilme quando comparada à exposição dos espécimes às soluções. Escovação com CHX a 2% e NaOCl a 1% resultaram em 100% de inativação do biofilme. A exposição aos agentes de limpeza resultou em redução significativa ( $p<0,0001$ ) na viabilidade celular, com CHX a 2% sendo o mais efetivo ( $p<0,0001$ ). A utilização de agentes de limpeza em associação ao método de escovação provou ser efetivo para reduzir biofilme *C. albicans*, sendo as soluções de CHX e NaOCl as mais efetivas.

Nos estudos sobre a aderência de *Candida albicans* às superfícies, são propostos diversos protocolos para a coleta, preparação e consequente exposição das amostras de saliva. Dessa forma, Zamperini et al.<sup>139</sup> (2012) investigaram se as variações dos parâmetros de centrifugação e número de doadores de saliva influencia na adesão de *C. albicans* em uma resina para base de prótese. As amostras ( $n = 72$ ) da resina acrílica polimerizada por energia de micro-ondas (Vipi Wave) foram fabricadas e divididas em quatro grupos: (a) controle - sem pré-condicionamento em saliva, (b) três grupos experimentais, nos quais os corpos-de-prova foram pré-condicionados com saliva obtida a partir de 15 voluntários e centrifugada a 12 000 g durante 5 min (G1); a partir de 15 voluntários e centrifugada a 18 000 g durante 30 min (G2), e a partir de um voluntário e centrifugada a 12 000 g durante 5 min (G3). A adesão de *Candida* foi avaliada pelo ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazólio (XTT) e pela coloração de violeta cristal. Os dados foram analisados por meio de análises de variância de um fator ( $P = 0,05$ ). Os resultados demonstraram que, para o ensaio de redução de XTT, os grupos G2, G3 não foram significativamente diferentes do controle, enquanto que o grupo G1 apresentou maior valor de absorbância comparado com o controle. Para a coloração com violeta de cristal não houve diferenças significativas entre todos os grupos. Os autores concluíram que as variações dos parâmetros de centrifugação e o número de doadores de saliva podem influenciar a aderência *C. albicans* sobre a superfície de resinas base de próteses.

Lazarin et al.<sup>68</sup> (2013) verificaram o efeito de vernizes fotopolimerizáveis experimentais contendo monômeros zwitteriônicos ou hidrofílicos na hidrofobicidade e na adesão de *C. albicans* em uma resina acrílica. Para isso, discos (13 X 2 mm) de uma resina acrílica polimerizada em micro-ondas (Vipi Wave) foram fabricados com superfícies lisas ou rugosas. Após a confecção das amostras, a rugosidade superficial

foi mensurada. Em seguida, os corpos-de-prova foram divididos em 13 grupos experimentais, sendo um grupo controle, no qual as amostras não receberam qualquer tratamento ou foram tratadas com um dos quatro tipos de vernizes experimentais (2-hidroxietil metacrilato - HE; 3-hidroxipropil metacrilato - HP; 2-trimetilamônio metacrilato clorídrico - T; metacrilato de sulfobetaina - S), em três concentrações diferentes 25, 30 ou 35% (HE25; HE30; HE35, HP25, HP30, HP35, T25, T30, T35, T25; S30, S35). A composição dos vernizes ainda continha monômero metacrilato de metila, dois agentes de ligação (trietileno dimetacrilato - TEGDMA e bisfenol-A-glicidil metacrilato - Bis-GMA) e um agente iniciador (4-metil benzofenona). Para o verniz S, aminopropil metacrilato foi também adicionado. A aplicação dos 12 vernizes nas superfícies das amostras foi realizada em uma câmara de fluxo laminar estéril, seguida de polimerização por 4 minutos em cada superfície de um forno EDG Strobolux. Para o verniz S, propano sulfone foi aplicado na superfície das amostras, e então estas foram mantidas numa estufa a 80°C durante 2 h. Posteriormente, todas as amostras foram armazenadas individualmente nos sacos plásticos devidamente rotulados contendo água destilada estéril durante 48 horas a temperatura ambiente para liberação de monômeros residuais. A hidrofobicidade da superfície foi mensurada pela avaliação do ângulo de contato. Previamente ao teste de adesão, metade das amostras de cada grupo experimental foi exposta em saliva, por 30 min. *C. albicans* ATCC 90028 foi cultivada em meio YEPD 37°C durante 48 h e então uma alça desta cultura jovem foi transferida para tubos Falcon contendo 20 ml de YNB suplementado com 50 mM de glicose e incubados a 37°C durante 21 h. A seguir, as células foram centrifugadas a 5000 g por 5 min, lavadas duas vezes com PBS e então ressuspensas em YNB suplementado com 100 mM de glicose. As suspensões de *Candida* foram padronizadas espectrofotometricamente a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL. Os corpos-de-prova foram colocados individualmente em cada poço de placas de cultura e juntamente com as amostras e 3 mL da suspensão padrão foi adicionada em cada orifício. As placas foram incubadas por 90 min a 37°C para permitir a adesão e, posteriormente, as células não aderidas foram removidas através da lavagem cuidadosa duas vezes com PBS. Os controles negativos foram amostras estéreis imersas em caldo YNB suplementado com glicose a 100 mM, sem células. Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata em três ocasiões distintas. As células da levedura aderidas foram quantificadas pelo ensaio de XTT. Ainda, a caracterização das superfícies recobertas pelos vernizes experimentais foi confirmada pela espectroscopia

de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Para superfícies rugosas, o verniz S (30 ou 35%) e HP (30%) resultaram em menores valores de absorvância comparados com o controle. Estes vernizes apresentaram superfícies mais hidrofílicas que o grupo controle. A rugosidade promoveu aumento da adesão apenas no grupo controle, e a saliva não influenciou na adesão. A análise de espectroscopia de fotoelétrons (XPS) confirmou a modificação química das amostras experimentais, em particular para os vernizes HP e S. Os vernizes S e HP reduziram significativamente a adesão de *C. albicans* da resina acrílica e podem ser considerados como um tratamento preventivo potencial para estomatite protética.

A interação do gênero *Candida* com outros micro-organismos pode determinar sua virulência. Foi demonstrado que biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Candida glabrata* estão relacionados com a ocorrência de estomatite protética. Além destes, *Streptococcus mutans* também são encontrados nos biofilmes de próteses. Assim, a limpeza adequada das próteses é essencial para prevenir doenças bucais e sistêmicas. Com base nestas considerações, Panariello<sup>89</sup> (2013) investigaram a eficácia da escovação com diferentes agentes de limpeza para reduzir a viabilidade de um biofilme multiespécies em resinas acrílicas. Amostras de Lucitone 550 (L) e Tokuyama Rebase Fast II (T) (10 mm x 2 mm) foram preparadas, esterilizadas e inoculadas com uma suspensão de  $10^7$  células/mL de *Candida albicans* e *Candida glabrata* e de  $10^8$  células/mL de *Streptococcus mutans*. As amostras foram incubadas por 48 h a 37 °C para a formação do biofilme. Em seguida, foram divididas (n = 12) e submetidas à escovação ou imersão durante 10 s nas soluções: água destilada (A); ácido peracético 0,2% (Ac), digluconato de clorexidina 1% (Chx), solução água/dentífrico 1:1 (D), hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) e perborato de sódio (Pb). Os micro-organismos viáveis foram avaliados por ensaio de XTT e contagem de colônias (ufc/mL). Os dados foram verificados por ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de 5%. A escovação com todos os agentes de limpeza apresentou maior redução da viabilidade do biofilme quando comparada com a imersão nas soluções para ambas as resinas. No entanto, a imersão em Ac e NaOCl foram tão eficientes quanto a escovação. O biofilme multiespécies em L e T foi totalmente removido por imersão em Ac e NaOCl por apenas 10 segundos.



*Proposição*

### **3 Proposição**

O objetivo foi verificar (i) a efetividade dos vernizes na prevenção da aderência dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*, (ii) a capacidade dos vernizes na prevenção da formação do biofilme multiespécies (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*), (iii) a eficácia da escovação mecânica na remoção do biofilme formado na superfície modificada e (iiii) a eficácia da escovação na recolonização do biofilme multiespécies.



# *Material e Método*

## 4 Material e Método

Para a realização do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais, instrumentos e equipamentos:

### 4.1 Materiais

1. Acetona a 0,4 mM Qhemis, fabricada por Vetec Química, Duque de Caxias, RJ, Brasil. Lote nº 100325;
2. Adesivo Super Bonder, fabricado por Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil;
3. Água destilada;
4. Água Milli-Q;
5. Avental cirúrgico descartável estéril, fabricado por Odontoprev Descartáveis, Araraquara, SP, Brasil;
6. Bacitracina, fabricado por Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº BCBC1908;
7. Catalisador para silicone de condensação Zhermack Indurent Gel, fabricado por Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália; Lotes nº. 119657;
8. Cloreto de potássio (KCl), fabricado por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil; Lote nº 310613;
9. Cloreto de sódio (NaCl), fabricado por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil; Lote nº 163229;
10. Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC number - 90028), Manassas, EUA;
11. Cultura de *Candida glabrata* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC number - 2001), Manassas, EUA;
12. Cultura de *Streptococcus mutans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC number - 25175), Manassas, EUA;
13. Embalagens auto selantes para esterilização Veda Max, fabricadas por Zermatt Indústria e Comércio Ltda, Itatiba, SP, Brasil;
14. Escovas dentais da marca Colgate, do tipo macia, fabricada por Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil;
15. Filtro para seringa 0.22M, fabricado por TPP, Trasadingen, Suíça;

16. Fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) fabricado por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil; Lote nº 127403;
17. Fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) fabricado por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil; Lote nº 147229;
18. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL, fabricada pela J Prolab Ind. e Com. De produtos para Laboratório Ltda, São José dos Pinhais, PR, Brasil;
19. Gás de óxido de etileno (mistura de 30% de oxido de etileno e 70% de gás carbônico), produzido pela White Martins Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
20. Gesso pedra tipo III Herodent; fabricado por Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
21. Glicose D Anidra PA ACS; fabricada por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil; Lote: 156674;
22. Gorro descartável, fabricado por Metalúrgica Fava Ind. e Com. Ltda, Pirituba, SP, Brasil;
23. Isolante indicado para resina acrílica, marca Cel-Lac, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
24. Líquido acrílico Vipi Wave, fabricado por VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil; Lote nº 22503;
25. Luva para procedimentos não estéril, fabricada por Supermax Brasil Importadora S/A, Curitiba, PR, Brasil;
26. Máscara descartável, fabricado por Metalúrgica Fava Ind. e Com. Ltda, Pirituba, SP, Brasil;
27. Meio de cultura Brain Heart Infusion caldo (BHI) fabricado por DIFCO, Detroit, MI, USA; Lote nº 103,500B;
28. Meio de cultura CHRO Magar, fabricado por Acumedia, Lansing, Michigan, EUA; Lote nº 2030514;
29. Meio de cultura Mitis Salivarius Agar (MSA), fabricado DIFCO, Detroit, MI, EUA; Lote nº 2017870;
30. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, produzido por Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA. Cód. 7143A. Lote nº 103-504;
31. Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB), fabricado por Himedia, Mumbai, Índia. Lote nº 143465;

32. Menadiona, produzida por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº 065K0230;
33. Placa de cultura TPP com 24 orifícios estéril, embaladas individualmente, fabricada pela TPP, Trasadingen, Suíça;
34. Placa de cultura TPP com 96 orifícios estéril, embaladas individualmente, fabricada pela TPP, Trasadingen, Suíça;
35. Placas de Petri descartáveis estéreis, de 90 mm de diâmetro por 15mm de altura, fabricada pela J Prolab Ind. e Com. De produtos para Laboratório Ltda, São José dos Pinhais, PR, Brasil;
36. Pontas descartáveis para micropipeta, fabricadas por Axygen Scientific, Union City, CA, EUA;
37. Resina para base de prótese incolor Vipi Wave, específica para micro-ondas, fabricada por VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil; Lote nº 11677;
38. Sacarose, fabricada por Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº 011M00421V;
39. Sabão de coco em pó UFE, fabricado por Rosatex Produtos Saneantes Ltda, Guarulhos, Sp, Brasil; Lote: 0596;
40. Silicone de condensação para inclusão de consistência pesada Zetaplus, fabricado por Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália; Lote nº. 140242;
41. Sistema de Filtração 250 mL, estéril, fabricado por TPP, Trasadingen, Suíça;
42. Sistema de Filtração 500 mL, estéril, fabricado por TPP, Trasadingen, Suíça;
43. Sistema de Filtração 1000 mL, estéril, fabricado por TPP, Trasadingen, Suíça;
44. Tubo Centrifugação graduado Axygen, Scientific, Union City, CA, EUA;
45. Tubos Falcon 15 mL, estéreis, fabricados por TPP, Trasadingen, Suíça;
46. Tubos Falcon 50 mL, estéreis, fabricados por TPP, Trasadingen, Suíça;
47. XTT, fabricado por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº SLB4187V.

## **4.2 Instrumental**

1. Alça descartável para inoculação de micro-organismos, Redplast Ind. E Com. de Embalagens Plásticas Ltda., Sarzedo, MG, Brasil;
2. Alça Drigalski, Quimi VidroLabor, Poá, São Paulo, Brasil;
3. Béquer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
4. Bico de Bunsen;
5. Butil de Le Cron, marca Duflex, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
6. Caneta para retroprojektor, fabricada por Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil;
7. Erlenmeyer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Com. De Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
8. Espátula de aço nº 36, marca Duflex, fabricada por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
9. Frasco de vidro com tampa para resina acrílica, fabricado por Jon, São Paulo, SP, Brasil;
10. Gral e espátula para gesso;
11. Jarra de anaerobiose, fabricada por BD GasPak EZ, Franklin Lakes, NJ, EUA; Lote: 1051136 e 1056381;
12. Matrizes metálicas contendo 10 cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura, fabricadas por L.F. Dessi & CIA Ltda, São Carlos, SP, Brasil;
13. Micropipeta de 0.5-10  $\mu\text{L}$ , modelo DV10, fabricada por HTL Lab Solutions, Warsaw, Polônia; Lote: 11367;
14. Micropipeta de 20-200  $\mu\text{L}$ , modelo DV200, fabricada por HTL Lab Solutions, Warsaw, Polônia; Lote: 12365;
15. Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$ , modelo DV1000, fabricada por HTL Lab Solutions, Warsaw, Polônia; Lote: 11523;
16. Micropipeta de 1000-5000  $\mu\text{L}$ , modelo DV5000, fabricada por HTL Lab Solutions, Warsaw, Polônia; Lote: 11373;
17. Micropipeta de 1000-10000  $\mu\text{L}$ , modelo DV10000, fabricada por HTL Lab Solutions, Warsaw, Polônia; Lote: 12368;

18. Mufla termoplástica, fabricada por Dental Vipi Ltda. Indústria e Comércio de Importação e Exportação de Produtos Odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil;
19. Pincel nº 6, fabricado pela Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil;
20. Pinça clínica, marca Duflex, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
21. Placas de vidros lisas (Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil) com rugosidade de aproximadamente 0,20  $\mu\text{m}$ ;
22. Placas de vidros jateados com óxido de alumínio (Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil) com rugosidade de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$ ;
23. Ponta Maxi-cut, fabricada por Labordental, São Paulo, SP, Brasil;

#### **4.3 Equipamentos**

1. Agitador de tubos orbital (Vórtex Mixer), fabricado por Vixar, Modelo: VM3000; Lote: E18111LA0071;
2. Autoclave vertical, fabricado por Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil. Modelo: AV 60. N°. 6614;
3. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: BG 400 nº 016450;
4. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: BG 440 N° 1010;
5. Cabina de Segurança Biológica, fabricada por Grupo Veco, Campinas, SP, Brasil. Modelo: Bio Seg Classe II – Tipo A;
6. Centrífuga, fabricada por Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha. Modelo: 5810R;
7. Contador de colônias CP 608 Plus, fabricado pela Phoenix Indústria e Comercio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil; Modelo: CP-608;
8. Espectrofotômetro – Biospectro, produzido por Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil. Modelo: SP-220;
9. Espectrômetro UNI-SPECS UHV, utilizado nas análises de XPS

10. Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil; Modelo: MA 0324; Série – 9819011;
11. Estufa de cultura, fabricada por Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil; Modelo: 002CB;
12. Estufa Quimis, fabricada por Quimis Aparelhos científicos LTDA, Diadema, São Paulo, Brasil;
13. Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: MA 033. Série: 9819;
14. Filtro a vácuo, produzido por Fanem, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: 089- CAL;
15. Incubadora de bancada shaker, fabricada por Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil. Modelo: Q816M20;
16. Forno para fotopolimerização Strobolux, fabricado por EDG Equipamentos, São Carlos, São Paulo, Brasil. Série: 02/0560;
17. Lavadora ultrassônica Soniclean 2, Sanders Medical, Santa Rita do Sapucaí, MG. Série: 001156;
18. Leitora automática de microplacas de 96 poços, 405-750nm, oito canais, fabricada por Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China. Modelo TP Reader;
19. Máquina de ensaios para a realização dos testes de escovação, desenvolvida por MAVTEC Comércio de Peças, Acessórios e Serviços Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;
20. Micro-ondas de dupla emissão de ondas, produzido por Brastemp, Manaus, AM, Brasil. Modelo: Sensor Crisp 38 – DES (Double Emission System);
21. Micro-motor odontológico de bancada LB 2000, produzido por Beltec Industria e Comércio de Equipamentos Odontológicos LTDA, Araraquara, SP, Brasil; Número de Série: LB2- 0101840; Lote: 48-3229/12
22. Prensa hidráulica PM 2000, fabricada por Vipi Delta, Pirassununga, São Paulo, SP, Brasil;
23. Rugosímetro Digital, fabricado por Mytutoyo Corporation, Tóquio, Japan; Modelo: SJ 400;

#### 4.4 Método

##### 4.4.1 Confeção dos corpos de prova

Para o desenvolvimento da pesquisa foi utilizada uma resina para base de prótese incolor, específica para micro-ondas Vipi Wave. Os corpos-de-prova foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas, contendo cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura (Figura 1).

Figura 1- Matriz metálica contendo cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura. Araraquara, 2013.



A resina acrílica foi incluída entre duas placas de vidros, lisas, com a finalidade de simular as características da parte polida das próteses (SL), ou jateadas com óxido de alumínio cuja rugosidade de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$  simula a rugosidade encontrada na superfície interna de próteses (SR)<sup>102, 142</sup>. Inicialmente, a parte inferior da mufla foi isolada e preenchida com gesso sobre o qual foi posicionada uma placa de vidro de forma e tamanho compatíveis com as dimensões da matriz metálica (Figura 2).

Figura 2- Base da mufla preenchida com gesso sobre a qual é posicionada a placa de vidro. Araraquara, 2013.



Após a presa do gesso, a matriz metálica foi isolada com isolante para gesso em ambos os lados. Silicone de condensação foi manipulado e posicionado ao redor da matriz, para facilitar a sua remoção na fase de desinclusão. Outra placa de vidro foi fixada sobre a matriz e a contra-mufla posicionada e preenchida com gesso de maneira convencional. Posteriormente à presa do gesso, a mufla foi aberta. A seguir, a resina foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante e, durante a fase plástica, inserida nos orifícios da matriz. A base da mufla foi coberta com uma folha de papel filme e fechada, seguida de prensagem em prensa hidráulica com pressão de 1,0 kg/f, até total escoamento do excesso de resina acrílica. A seguir, a mufla foi aberta, o papel filme removido e o excedente eliminado com auxílio de espátula Le Cron. A mufla foi novamente fechada e levada à prensa hidráulica com pressão de 1,5 kg/f pelo tempo de 2 horas. Após este período, o processo de polimerização em micro-ondas executado de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Forno de 1000 W – 20 min com 20/30% de potência + 5 min com 80/100% de potência). Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mufla foi aberta e os corpos-de-prova retirados, sendo os excessos laterais removidos com o auxílio de uma ponta estéril Maxi-Cut (Figuras 3 A e B).

Figura 3- Corpos de prova obtidos. A – superfície lisa; B – superfície rugosa. Araraquara, 2013.



Os corpos-de-prova (com superfície lisa ou rugosa) foram confeccionados dentro de condições assépticas, por um único operador, atuando sobre superfície de papel estéril, utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis.

#### ***4.4.2 Mensuração da rugosidade superficial***

Tendo em vista a possível influência da rugosidade na aderência dos micro-organismos, foi realizada a medida da rugosidade superficial de todos os corpos-de-

prova, utilizando-se um rugosímetro (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japão), com precisão de leitura de 0,01  $\mu\text{m}$ , comprimento de leitura de 2,4 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e o raio da ponta ativa de 5  $\mu\text{m}$  (Figura 4).

Figura 4- Rugosímetro Mitutoyo SJ 400. Araraquara, 2013.



Foram realizadas quatro medidas para cada corpo de prova e a média entre as leituras foi determinada como o valor da Ra ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 5). Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

Figura 5- Mensuração da rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) dos corpos de prova. Araraquara, 2013.



#### ***4.4.3 Aplicação dos vernizes experimentais***

Os vernizes experimentais foram utilizados em três concentrações (25, 30 e 35%) de acordo com o tipo de monômero (hidrofílico ou zwitteriônico) (Tabela 1A - Apêndice). Dessa forma, foram avaliados grupos experimentais e controles (que não receberam tratamento com verniz), para cada tipo de superfície (lisa e rugosa).

A aplicação dos 6 vernizes experimentais (3  $\mu\text{L}$ ), nas duas superfícies dos corpos-de-prova foi realizada no interior de uma câmara de fluxo laminar estéril (Figuras 6 e 7), seguida da fotopolimerização durante 4 minutos para cada superfície, em forno de fotopolimerização Strobolux (Figura 8). O verniz M recebeu uma camada adicional de sultone nas duas superfícies, e permaneceu durante 2 horas a 80°C em estufa, para completar a formulação do verniz (2 passos). Todos os dispositivos necessários para a aplicação dos vernizes, incluindo o forno EDG, foram acondicionados no interior da câmara de fluxo laminar e expostos à luz ultravioleta durante 30 minutos, previamente à aplicação dos vernizes, para a esterilização do ambiente. A desinfecção interna do forno foi realizada com álcool 70%, para posterior utilização.

Figuras 6 e 7 - Aplicação dos vernizes experimentais em condições assépticas. Araraquara, 2013.

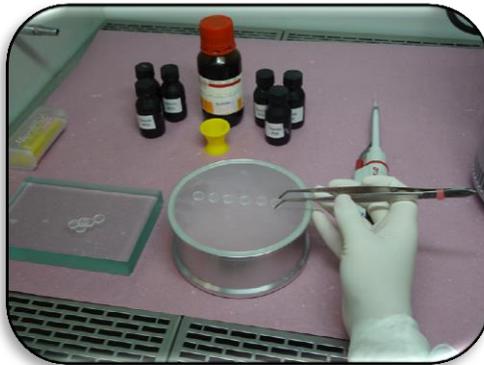


Figura 8- Fotopolimerização dos vernizes experimentais em forno Strobolux. Araraquara, 2013.



Os corpos-de-prova de todos os grupos (controle e experimentais) foram, então, armazenados em estufa a 37°C durante 48 horas, em sacos plásticos estéreis, hermeticamente fechados, contendo água destilada estéril, para liberação dos monômeros residuais (ISO/FDI 1567).

#### ***4.4.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)***

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) permitiu a análise da composição e estrutura de superfície dos corpos-de-prova após a aplicação dos vernizes. Para a análise, foram confeccionadas, adicionalmente ao número total de corpos-de-prova, 1 amostra do grupo controle e 1 amostra tratada com cada um dos vernizes na concentração 35%. Foi utilizado o espectrômetro UNISPECS UHV, sendo empregada linha MgK $\alpha$  ( $E=1253.6\text{eV}$ ) e a energia de passo do analisador foi ajustada para 10eV. O método Shiley foi utilizado para subtrair o ruído ineslático dos espectros de núcleo C 1s, O 1s e N 1s, cujas energias de ligação do espectro foram corrigidas pelo componente hidrocarbono do polímero fixado em 285.0 eV. A composição da camada da superfície foi determinada pelas proporções das áreas de picos relativas corrigidas pelos fatores de sensibilidade dos elementos correspondentes. Os espectros foram deconvoluídos utilizando uma função do tipo Voigtiana para ajustar os espectros sem restrição. A largura à meia altura (FWHM), variou entre 1,6 e 2,0 eV e a posição dos picos foi determinada com precisão de  $\pm 0,1$  eV. A análise por XPS foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Araraquara.

#### 4.4.5 Esterilização dos corpos de prova

Previamente aos testes microbiológicos, os corpos-de-prova foram submetidos a banho em ultrassom, por 20 minutos. Em seguida, na capela de fluxo laminar, os corpos de prova foram expostos à luz ultravioleta por 20 minutos, para cada face do corpo de prova, com o objetivo de eliminar possíveis micro-organismos.

#### 4.4.6 Adesão e formação do biofilme multiespécies nos corpos de prova

##### 4.4.6.1 Inóculos e Meios

Foram utilizados os micro-organismos *S. mutans* ATCC 25175, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 2001. Para o preparo do inóculo, o *S. mutans* foi semeado de sua cultura original Mitis Salivarius Agar (MSA), a uma temperatura de 37°C em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10% por 48 horas. As espécies de *Candida* foram semeadas em placas de Petri sobre o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (SDA) e incubadas a 37°C por 48 horas, em atmosfera de aerobiose. Após este período de ativação, uma alçada da bactéria ou das leveduras recém cultivadas foi adicionada em frascos contendo, respectivamente, 20 mL de meio Brain Heart Infusion caldo (BHI) ou Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com glicose a 50 mM. Após a incubação em agitador orbital a 37 °C por 18 horas em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%, para o *S. mutans* e por 21 horas para as espécies de *Candida*, as células foram centrifugadas a 5.000 rotações por min em uma centrífuga, durante 5 min, e lavadas duas vezes com PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação a 5.000 rotações por min, durante 5 min.

As células lavadas, tanto da bactéria quanto das leveduras, foram ressuspensas em 20 mL de caldo BHI estéril. A densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada a uma concentração de 1x10<sup>8</sup> células/mL para o *S. mutans*<sup>35, 96</sup> e de 1x10<sup>7</sup> células/mL para as espécies de *Candida*<sup>16, 96</sup>, utilizando-se espectrofotômetro. A absorbância mensurada para o *S. mutans* foi de 0,01 a 600 nm e para as espécies de *Candida* foi de 0,60 a 520 nm.

##### 4.4.6.2 Coleta, preparo e pré-tratamento dos corpos-de-prova com saliva humana

Com a finalidade de verificar o efeito da película salivar na aderência do biofilme multiespécies, metade dos corpos-de-prova confeccionados foram expostos em saliva, previamente a todos os testes microbiológicos. Foram coletados 20 mL de

saliva não estimulada de 70 indivíduos sadios, com idade entre 20 e 30 anos. Durante a coleta, o tubo coletor ficava acondicionado em béquer contendo gelo no interior, com a finalidade de manter a saliva refrigerada. A seguir, a saliva foi misturada, homogeneizada e submetida a centrifugação a 5.000 g por 10 minutos, a 4°C<sup>68, 69</sup>. O sobrenadante obtido foi então filtrado e armazenado a -70 °C até a realização dos testes microbiológicos, quando os corpos-de-prova foram incubados com 1,5 ml da saliva preparada, à temperatura ambiente, por 30 minutos<sup>129, 137</sup>. Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Protocolo n° 12/2010) (Apêndice) e todos os indivíduos voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo).

#### *4.4.6.3 Adesão (90 minutos)*

Para verificar se a efetividade dos vernizes experimentais ocorre na fase de aderência, em uma placa de cultura contendo 24 orifícios foi transferida uma alíquota de 0,7mL de cada suspensão celular padrão para cada orifício contendo um corpo de prova. A seguir, esta placa foi levada ao agitador orbital a 37°C sob agitação de 75 rotações por minuto (rpm), em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%, e mantida por 90 minutos (fase de adesão)<sup>16</sup>. Após este período os corpos-de-prova foram lavados cuidadosamente com 2 mL de solução PBS estéril. Essa lavagem foi realizada duas vezes com a função de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos. A seguir foi realizada a mensuração da quantidade de células aderidas aos corpos-de-prova através do ensaio de XTT e pela contagem de colônias viáveis (UFC). A Figura 16 demonstra o desenho experimental desta fase.

#### *4.4.6.4 Formação do biofilme maduro (48 horas)*

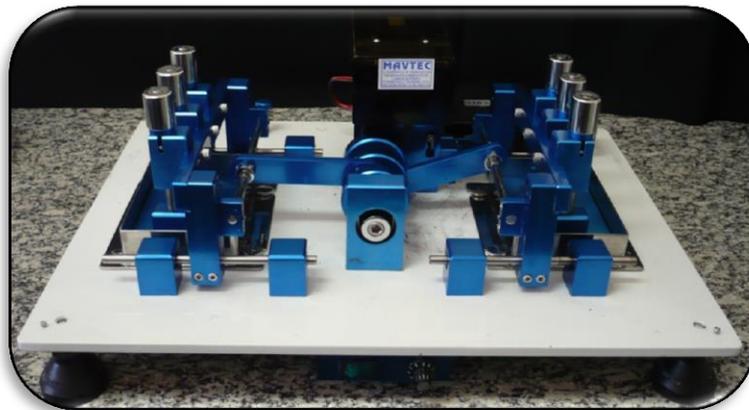
O biofilme multiespécies foi formado em placas de cultura pré-estéreis de 24 orifícios. Da mesma forma como realizado para a aderência, uma alíquota de 0,7 mL da suspensão celular padrão de cada micro-organismo foi transferida para cada orifício contendo um corpo de prova e as placas foram incubadas por 90 min, em agitador orbital a 37 °C (75 rpm) e atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%. Após este período, os corpos-de-prova foram lavados (2 vezes) cuidadosamente com 2 mL de solução PBS estéril. Em seguida, 2 mL de BHI estéril foram adicionados em cada orifício com o objetivo de fornecer mais nutrientes para os micro-organismos e as placas foram novamente mantidas a 37 °C sob agitação de 75 rpm, em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%, durante 48

h. A quantificação celular, da mesma forma como apresentado para a adesão, foi realizada pelo ensaio de XTT e pela contagem de células viáveis (UFC). Pela Figura 17 é possível visualizar o desenho experimental desta etapa.

#### **4.4.7 Ensaio de escovação**

Para a mensuração da quantidade de biofilme removido pela escovação, corpos-de-prova de cada grupo experimental foram confeccionados, e submetidos aos procedimentos microbiológicos, incluindo a exposição prévia em saliva e formação do biofilme. A seguir, as amostras com o biofilme aderido à superfície foram levadas a máquina de escovação (Figura 9).

Figura 9 – Máquina de escovação utilizada para os ensaios de escovação. Araraquara 2013.



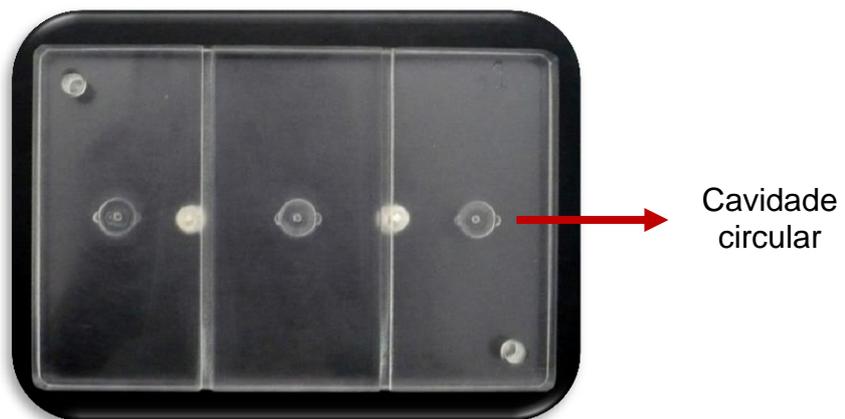
Previamente ao ensaio de escovação, a máquina foi acondicionada na capela de fluxo laminar e submetida a luz UV por 20 minutos para a esterilização do ambiente. Ainda, após cada ciclo de escovação, os dispositivos que entram em contato direto com o biofilme foram esterilizados em micro-ondas a 650W por 3 minutos. Já as escovas dentais foram esterilizadas por meio de óxido de etileno (ACECIL – Central de Esterilização e Ind. LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) (Figura 10). Este procedimento foi selecionado por ser considerado efetivo e seguro para a esterilização de polímeros<sup>72, 90</sup>.

Figura 10 – Escova dental esterilizada por óxido de etileno embalada individualmente. Araraquara 2013.



A máquina de escovação apresenta duas bases horizontais acrílicas removíveis com três cavidades circulares em cada base, nas quais os corpos-de-prova foram posicionados durante os ensaios de escovação. Essas cavidades circulares (Figura 11) apresentam as mesmas dimensões dos corpos-de-prova, permitindo, dessa forma, o seu correto encaixe e apreensão durante os testes.

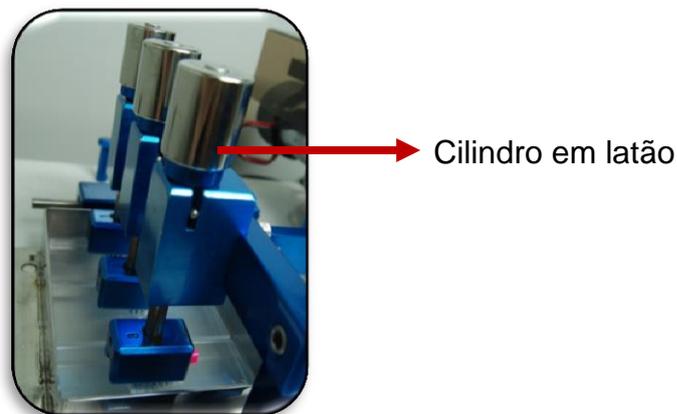
Figura 11 - Cavidade circular que permite o encaixe do corpo de prova durante a realização do ensaio de escovação. Araraquara 2013.



Em cada base horizontal, existe ainda uma parede metálica com 33 mm de altura. Esta moldura contorna as cavidades retangulares, gerando um compartimento quadrangular que contém a solução de escovação, permitindo que os corpos-de-prova permaneçam imersos durante a execução dos ensaios. Na parte central da base máquina, encontra-se o motor unido a dois braços metálicos que acoplam 6 dispositivos metálicos (3 em cada braço), os quais permitem o encaixe das partes ativas das escovas dentais. Primeiramente, os cabos das escovas foram seccionados, de forma a restar somente as partes ativas (“cabeça” da escova), que então foram

posicionadas nos dispositivos metálicos. Esses dispositivos apresentam, superiormente, pinos metálicos sobre os quais são colocados cilindros confeccionados em latão. A função dos cilindros é exercer força constante de 200 g sobre as porções ativas das escovas durante os testes de escovação (Figura 12).

Figura 12 - Cilindros de latão da máquina de escovação que exercem força constante de 200 g



O acionamento do motor induz a movimentação do conjunto braço metálico-dispositivo das escovas dentais, realizando movimentos cíclicos horizontais de amplitude controlada, permitindo um deslocamento linear das escovas de 18 mm para cada lado.

A máquina apresenta capacidade de realizar, no máximo, 3.600 ciclos por hora. O controle de ciclos por minuto (C.P.M.) regula o número de movimentos horizontais cíclicos da mesa. Esse registro é realizado por um contador de ciclos, localizado na base da máquina. A capacidade máxima de registros é 99.999. Neste estudo, para cada ensaio, foram realizados 30 ciclos, o que representa a escovação realizada em 1 dia<sup>32, 44, 78, 113</sup>.

O compartimento presente na base horizontal da máquina foi preenchido com solução água destilada/sabão de coco (proporção 1:1). Foi utilizada solução suficiente para imergir completamente os corpos-de-prova.

Após a escovação, os corpos-de-prova foram submetidos à avaliação dos micro-organismos não removidos e/ou eliminados por meio do ensaio do XTT e pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), conforme desenho experimental apresentado na Figura 18.

#### **4.4.8 Recolonização do biofilme multiespécies após a escovação.**

Com a finalidade de verificar a efetividade da escovação após longos períodos, corpos-de-prova de cada grupo experimental, conforme desenho experimental demonstrado pela Figura 19, foram submetidos a formação do biofilme, seguidos da escovação, como previamente descrito. Após a escovação, as amostras foram cuidadosamente transferidas para novas placas de 24 orifícios. A seguir, 2mL de BHI estéril foi colocado em cada um dos orifícios contendo um corpo de prova cada. As placas foram então mantidas em agitador orbital a 37°C sob agitação de 75 rotações por minuto (rpm), em atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%, e mantida por período adicional de 48 horas. Após este período, o metabolismo celular e as unidades formadoras de colônias foram mensuradas pelos testes de XTT e UFC, respectivamente.

#### **4.4.9 Mensuração do metabolismo celular e número de células viáveis**

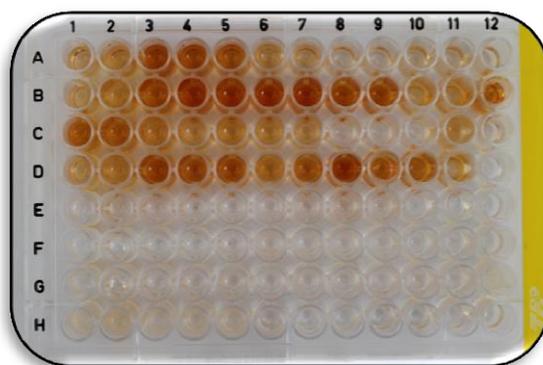
##### **4.4.9.1 Ensaio de XTT**

A mensuração dos micro-organismos aderidos, do biofilme formado, da efetividade da escovação e da efetividade da escovação na recolonização do biofilme foi monitorada através do ensaio de redução de 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT). Este ensaio tem sido rotineiramente utilizado para a quantificação de biofilmes de *Candida* por sua capacidade de mensurar a atividade metabólica celular<sup>25, 101</sup>. O XTT (sal amarelo) é reduzido, por desidrogenases mitocondriais de micro-organismos metabolicamente ativos, em um produto formazano solúvel em água (laranja) o qual é medido espectrofotometricamente. Para o ensaio, duas soluções foram utilizadas: a solução de XTT e a solução de menadiona. A solução de XTT foi preparada utilizando-se água ultra pura a uma concentração de 1 mg/ml e mantido a -70 °C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes da sua utilização.

Metade dos corpos-de-prova de todas as condições experimentais foram individualmente transferidos para novas placas de cultura de células estéreis com 24 orifícios contendo 2 mL de PBS suplementado com glicose a 200 mM, solução de XTT previamente preparada e menadiona recém-preparada, na seguinte proporção: 158 µl de PBS 200 mM, 40 µl de XTT e 2 µl de menadiona. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 h<sup>25</sup> e, após esse período, o produto da degradação do XTT (sobrenadante) presente em cada orifício foi homogeneizado com uma pipeta.

A seguir, uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um eppendorf e centrifugada a 5.000 rpm durante 2 min para a precipitação das células. Então, 200 µL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidos para o orifício de uma placa de leitura (Elisa) com 96 orifícios e o resultado desta reação química foi mensurado utilizando-se o espectrofotômetro com filtro 492 mM (Figura 13).

Figura 13 - Produto da degradação do XTT após 3 h de incubação em uma placa de elisa para leitura em espectrofotômetro. Araraquara, 2013.



#### 4.4.9.2 Contagem do número de colônias viáveis

Para a quantificação das células, após a adesão, formação do biofilme, escovação e recolonização, os corpos-de-prova contidos nas placas de 24 orifícios foram lavados 2 vezes em solução de PBS<sup>30, 96, 124</sup>, com a finalidade de remover as células não aderidas. A seguir, as amostras foram transferidas para tubos Falcon estéreis contendo 4,5 mL de PBS, e então agitados por 1 minuto para o desprendimento das células<sup>80</sup>.

Posteriormente, o processo de diluição seriada foi realizado em solução de PBS estéril por meio da transferência de alíquotas de 100 µL da solução original (Romeiro RS). As diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram obtidas e duas alíquotas de 10 µL da diluição  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram semeadas, em duplicata, pela técnica da gota<sup>37, 107, 108, 132, 143</sup>, em uma placa de Petri contendo Chromagar, para a contagem das espécies de *Candida* e para a espécie *S. mutans*, duas alíquotas de 10 µL da diluição  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram semeadas em uma placa de Petri contendo Mitis Salivarius. O plaqueamento das diluições acima foi escolhido após a realização de teste piloto para verificar quais as melhores diluições a serem realizadas para favorecer a contagem de colônias.

A seguir, todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sendo que as placas de Mitis Salivarius foram incubadas em ambiente com atmosfera com PCO<sub>2</sub> de 10%. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias digital e o número de colônias determinado (seleciona-se a diluição que contenha entre 3 a 30 colônias) (Figuras 14 e 15). Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:  $ufc/mL = \text{número de colônias} \times 10^n / q$ . Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 4) e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (0,010 mL = 10 µL).

Figura 14 – Placa de Chromagar com as colônias da *C. albicans* (em verde/azul) e *C. glabrata* (em roxo). Araraquara 2013.

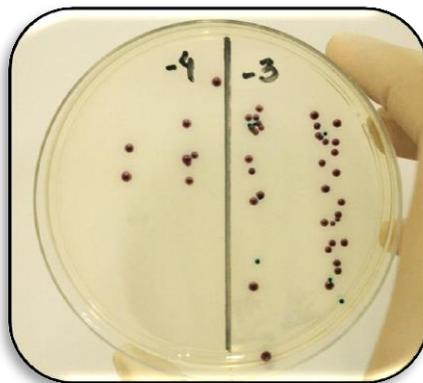
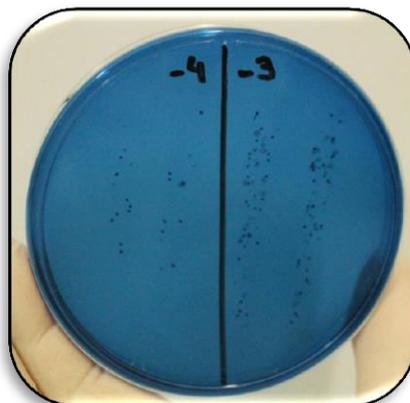


Figura 15 – Placa de Mitis Salivarius com as colônias do *S. mutans*. Araraquara 2013.



#### **4.4.10 Metodologia Estatística**

As avaliações dos efeitos dos tratamentos com vernizes, em diversas concentrações, sobre a adesão e formação de biofilme de micro-organismos determinadas por dois métodos: XTT e unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizadas por análises de variância. Essas análises se referiram a quatro fatores: tipo de superfície (lisa ou rugosa); verniz (M ou P); concentração (25%, 30% ou 35%) e saliva (ausente ou presente), incluindo controles sem a aplicação dos vernizes. Os valores de ufc/mL determinados pelo método de contagem de colônias foram transformados para logaritmo, de forma a viabilizar a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey de comparações múltiplas de médias (HSD de Tukey) foi adotado para complementar essas análises. Em todas elas adotou-se nível de significância de 1% para a tomada de decisão, nível um pouco menor do que o usual para evitar significâncias sem relevância clínica. Destaque-se que a rugosidade dos corpos de prova, a eficácia da escovação mecânica na remoção do biofilme e na sua recolonização foram avaliadas apenas por estatísticas descritivas. Todos os testes avaliados foram realizados em triplicata em 3 ocasiões distintas, para cada associação entre verniz/ concentração/ saliva, totalizando 18 corpos-de-prova por grupo. Adicionalmente, o grupo controle negativo, isto é, sem a presença dos micro-organismos, somente com meio de cultura e a amostra foi incluído em todos os experimentos com a finalidade de verificar a esterilização dos materiais, meios de cultura e corpos-de-prova utilizados. Este planejamento foi realizado tanto para as amostras lisas, como para as rugosas. O diagrama experimental do estudo estão expostos nas Figuras 16, 17, 18 e 19.

Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico Statistica 6.0 da Statsoft (Statistica 6.0, Statsoft, Tulsa, Okla, USA).

Figura 16 - Efetividade dos vernizes fotopolimerizáveis experimentais na adesão dos micro-organismos (90 minutos)

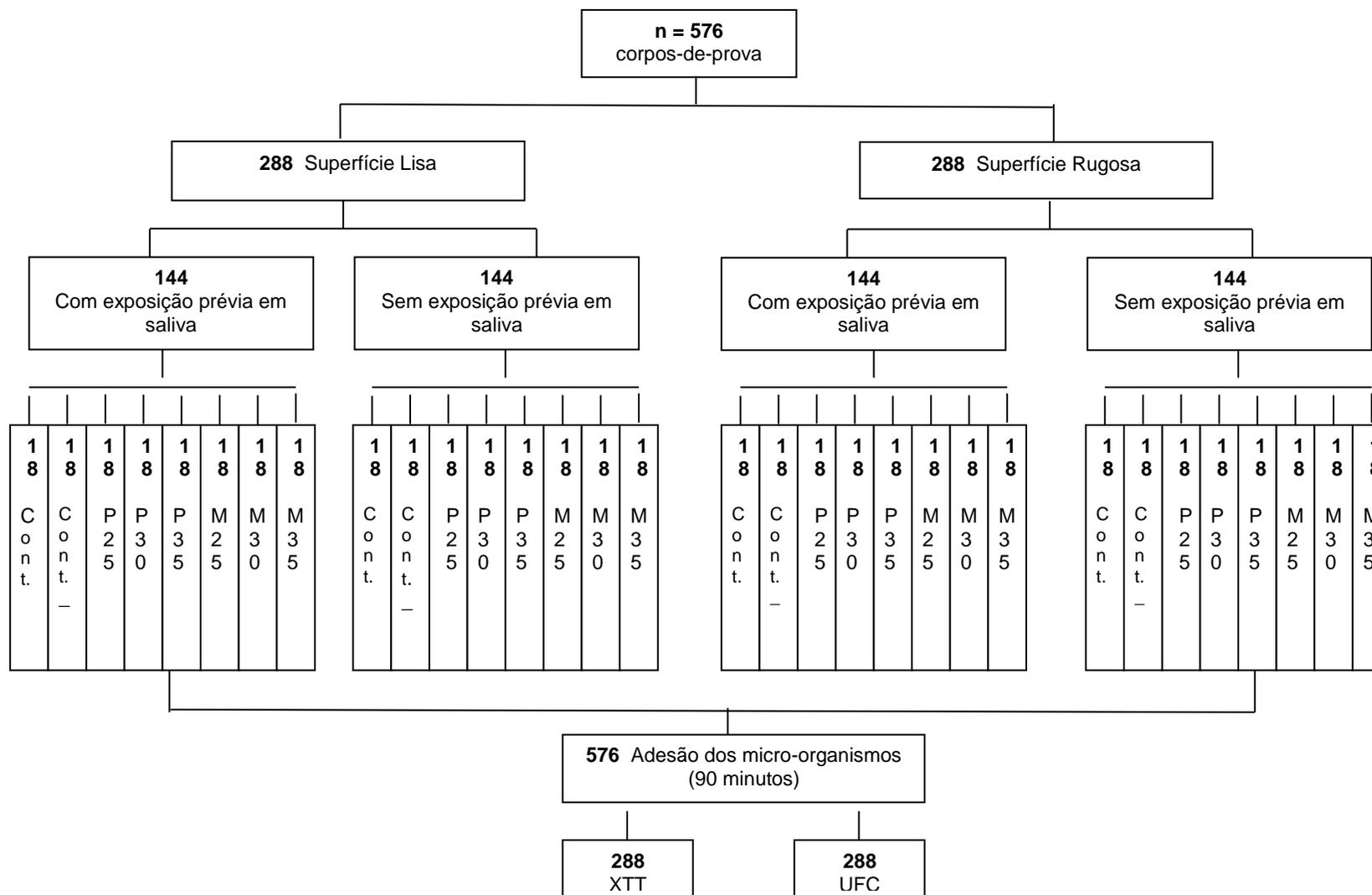


Figura 17 - Efetividade dos vernizes fotopolimerizáveis experimentais na formação do Biofilme maduro (48 horas)

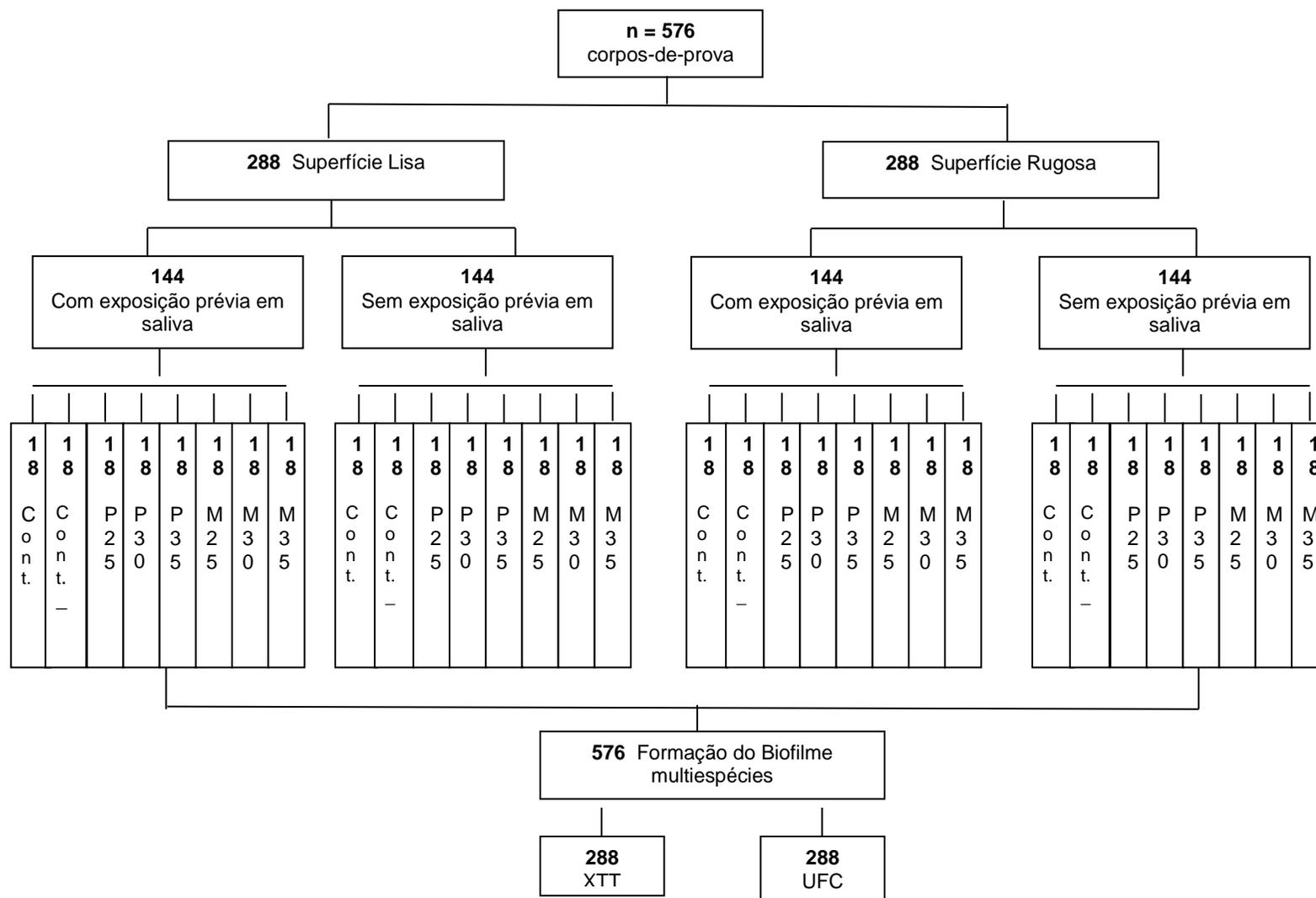


Figura 18 - Eficácia da escovação mecânica na remoção do biofilme multiespécies formado sobre as superfícies modificadas com os vernizes

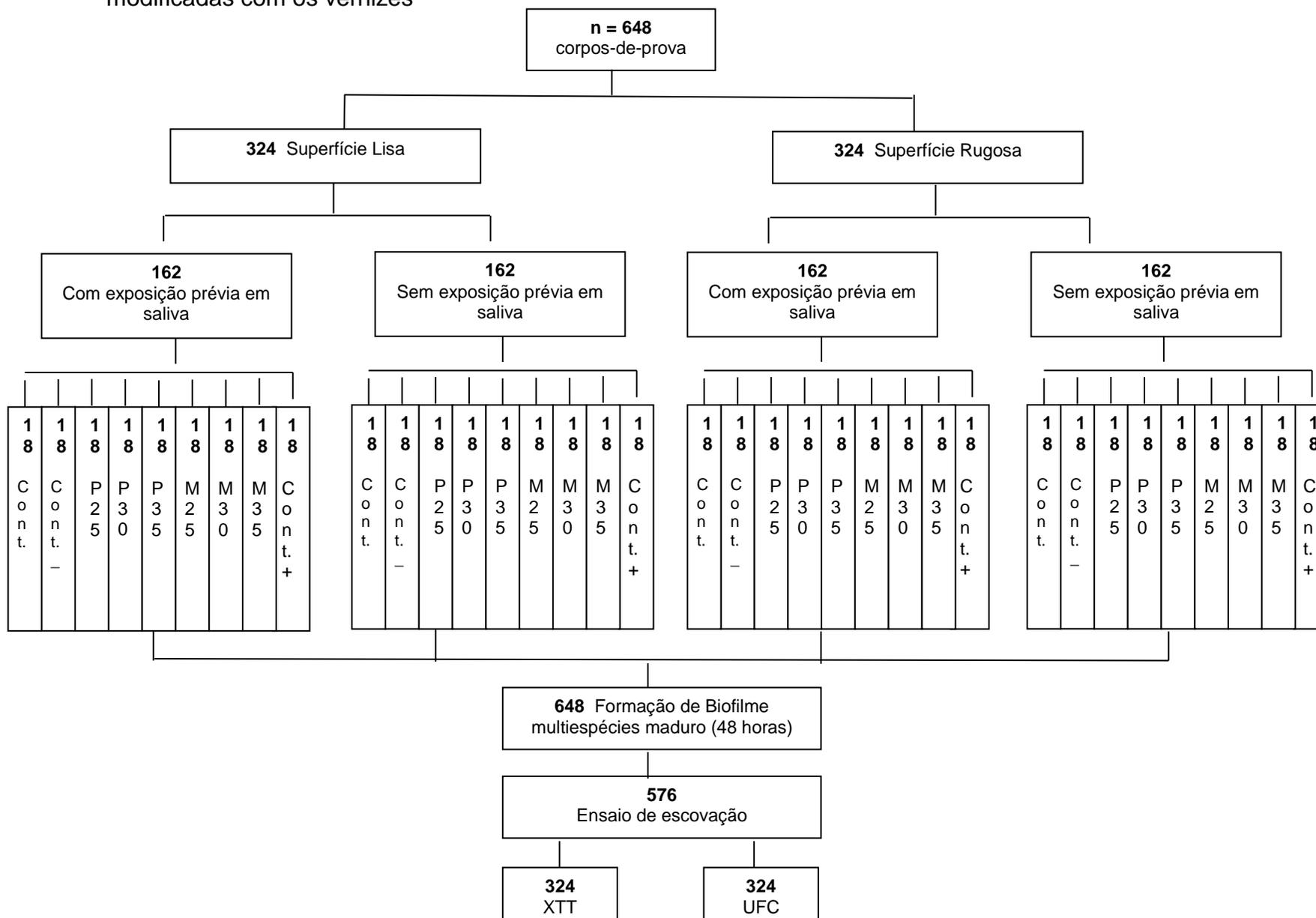
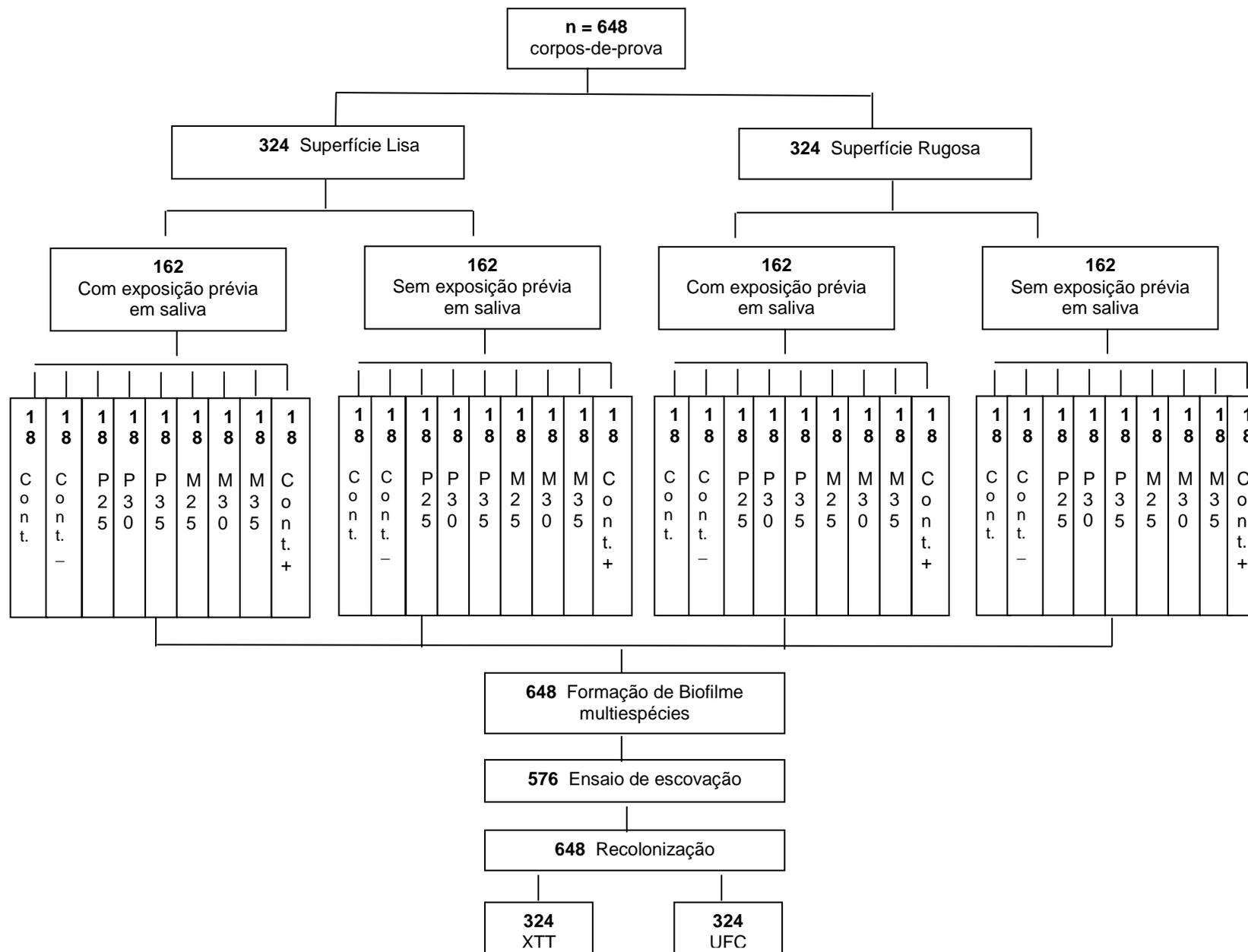


Figura 19 – Recolonização do biofilme multiespécies após escovação





*Resultado*

## 5 Resultado

Os dados de todas as condições experimentais avaliadas (rugosidade superficial, absorvâncias e contagem de colônias) encontram-se no Apêndice. As tabelas A3 a A16 demonstram os dados de rugosidade superficial, as tabelas A17 a A32 apresentam os valores de absorvância obtidos pelo ensaio de XTT e as tabelas A33 a A48 contém os valores de ufc/mL.

### 5.1 Caracterização da superfície por XPS

A Tabela 1 demonstra as porcentagens dos elementos químicos presentes na superfície das amostras (controle e vernizes experimentais M e P na concentração 35%), obtidas através da análise por XPS. Por esta tabela pode ser visualizado que a aplicação do verniz P promoveu uma diminuição na porcentagem do elemento C 1s, um aumento na porcentagem do O 1s e Si 2p, além de um pico de fósforo. Para o verniz M, ocorreu um aumento da porcentagem do C 1s, uma redução do O 1s e também foi encontrado um pico de enxofre.

Tabela 1– Porcentagens dos elementos químicos (at.%) presentes na superfície das amostras (controle e vernizes experimentais M e P na concentração 35%), obtidas através da análise por espectroscopia eletrônica por raios X (XPS). Araraquara, 2013.

Elementos (at.%)	Grupos		
	Controle	P35	M35
Carbono (C 1s)	72,54	66,98	78,97
Oxigênio (O 1s)	27,45	28,03	12,63
Silício (Si 2p)	0,2	5,81	2,7
Fósforo (P 2p)	-	0,56	-
Enxofre (S 2p)	-	-	0,78

at.%: porcentagem atômica

### 5.2 Rugosidade superficial

Inicialmente, para o estudo da adesão e formação do biofilme multiespécies (*C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*) e para o estudo da eficácia da escovação na remoção e recolonização do biofilme, foi mensurada a rugosidade de 1.224 amostras de superfície lisa e de outras 1.224 de superfície rugosa. A rugosidade do conjunto de amostras lisas variou de 0,04  $\mu\text{m}$  a 0,34  $\mu\text{m}$  com média 0,17  $\mu\text{m}$ , enquanto a rugosidade relativa dos corpos-de-prova rugosos ficou entre 2,64  $\mu\text{m}$  e 4,45  $\mu\text{m}$  com

média 3,45  $\mu\text{m}$ . Estes dados demonstram que o planejamento experimental do estudo foi mantido, sendo a diferença entre a rugosidade das amostras lisas e rugosas por volta de 3,30  $\mu\text{m}$ .

### 5.3 Adesão do biofilme multiespécies

Na Tabela 2 são mostradas as médias e desvios padrão de absorbâncias determinadas pelo método XTT no estudo da adesão dos micro-organismos (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*). Uma análise de variância de quatro fatores foi empregada para avaliar a aderência de micro-organismos pela medição da absorbância. O sumário desta análise, dado na Tabela A49 do Apêndice, sugere, ao nível de significância de 1%, efeito significativo somente de tipo de superfície ( $p=0,001$ ) e da interação entre verniz, concentração e tipo de superfície ( $p=0,001$ ). O teste de Tukey foi empregado para estudar esta interação com o resultado resumido na Tabela 2, válido independentemente da aplicação de saliva.

Observa-se que todos os tratamentos diminuíram as médias de absorbância em relação ao controle. Para a superfície lisa, não há evidência de diferença significativa entre as médias seja qual foi o tratamento dotado. Neste caso, o metabolismo celular ficou entre 62% e 72% do controle. Já para a superfície rugosa, as médias de absorbância relativa ao verniz M na concentração 25% e ao verniz P na concentração 30% ficaram em um patamar maior, com o metabolismo celular na faixa de 75% a 80%, mais próximas do controle. As outras acompanharam os metabolismos celulares das superfícies lisas.

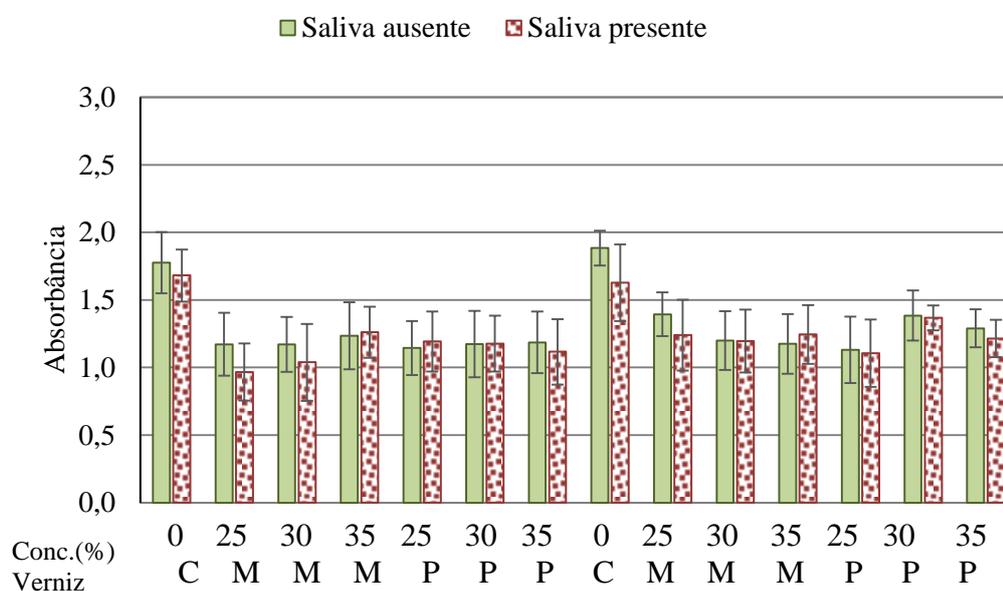
Na Figura 20 estão as representações gráficas das médias amostrais de absorbâncias, juntamente com intervalos de confiança de 99% para as médias populacionais. Além de permitir a visualização dos resultados obtidos, eles fornecem a precisão sobre as médias.

Tabela 2 – Média (desvio padrão) de absorvâncias pelo método XTT, para o teste de adesão do biofilme multiespécies, de acordo com o tipo de superfície (lisa ou rugosa), ausência ou presença de saliva, tipo de verniz (M ou P). Araraquara 2013.

Superfície	Verniz Conc. (%)	s/saliva	c/saliva	Global <sup>A</sup>	VC (%) <sup>B</sup>	
Lisa	Controle	1,78 (0,20)	1,68 (0,17)	1,73 (0,19) <sup>d</sup>	100	
	M	25	1,17 (0,21)	0,97 (0,19)	1,07 (0,20) <sup>a</sup>	62
		30	1,17 (0,18)	1,04 (0,26)	1,10 (0,22) <sup>ab</sup>	64
		35	1,23 (0,22)	1,26 (0,17)	1,25 (0,20) <sup>abc</sup>	72
	P	25	1,14 (0,18)	1,19 (0,20)	1,17 (0,19) <sup>abc</sup>	68
		30	1,17 (0,22)	1,18 (0,18)	1,17 (0,20) <sup>abc</sup>	68
		35	1,19 (0,20)	1,12 (0,22)	1,15 (0,21) <sup>abc</sup>	67
	Rugosa	Controle	1,88 (0,12)	1,63 (0,25)	1,76 (0,20) <sup>d</sup>	100
		M	25	1,39 (0,14)	1,24 (0,23)	1,32 (0,19) <sup>bc</sup>
30			1,20 (0,20)	1,20 (0,21)	1,20 (0,20) <sup>abc</sup>	68
35			1,18 (0,20)	1,24 (0,20)	1,21 (0,20) <sup>abc</sup>	69
P		25	1,13 (0,22)	1,11 (0,22)	1,12 (0,22) <sup>ab</sup>	64
		30	1,38 (0,17)	1,37 (0,08)	1,38 (0,13) <sup>c</sup>	78
		35	1,29 (0,13)	1,21 (0,12)	1,25 (0,12) <sup>abc</sup>	71

<sup>A</sup>Agrupando com e sem saliva. <sup>B</sup>Metabolismo celular em relação ao controle. Nota: Médias globais com letras iguais na coluna não são significativamente diferentes ao nível de 1% (não houve efeito significativo da saliva)

Figura 20 – Média amostral (coluna) de absorvâncias e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical), para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.



Na Tabela 3 são dadas as médias e desvios padrão de logaritmos de ufc/mL para os três micro-organismos em estudo. Ao nível de significância de 1%, as três análises de variância (sumários nas Tabelas A50 a A52 do Apêndice) apresentaram efeito significativo somente de tipo de superfície ( $p \leq 0,001$ ). Entretanto, apesar de maior, a média global de logaritmos de ufc/mL da superfície rugosa foi sempre próxima da média global relativa à superfície lisa. As viabilidades celulares ficaram sempre acima de 90%, tomando-se o controle como a referência 100%.

Nas Figuras 21 a 23 estão representadas as médias amostrais de logaritmos de ufc/ml, respectivamente, para os microrganismos *Cândida albicans*, *Cândida Glabrata* e *Streptococcus mutans*. Esses gráficos incluem intervalos de confiança de 99% para as médias populacionais os quais, como acentuado anteriormente, fornecem estimativas da precisão sobre as médias.

Tabela 3 – Média (desvio padrão) de logaritmos de ufc/mL, para o teste de adesão do biofilme multiespécies, de acordo com o tipo de superfície (lisa ou rugosa), ausência (s/s) ou presença (c/s) de saliva e tipo de verniz (M ou P). Araraquara 2013.

Verniz	Conc. (%)	Microrganismo		
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
Superfície lisa				
s/s	Controle	5,63 (0,35)	6,42 (0,36)	6,53 (0,35)
M	25	4,96 (0,38)	6,05 (0,17)	6,04 (0,28)
	30	4,86 (0,51)	5,95 (0,33)	5,98 (0,13)
	35	5,11 (0,39)	6,13 (0,37)	6,09 (0,18)
P	25	5,16 (0,31)	6,21 (0,13)	6,32 (0,20)
	30	5,04 (0,62)	6,17 (0,25)	6,10 (0,15)
	35	4,85 (0,69)	6,09 (0,15)	6,07 (0,31)
c/s	Controle	5,24 (0,30)	6,41 (0,26)	6,43 (0,36)
M	25	4,89 (0,28)	6,00 (0,28)	6,01 (0,22)
	30	4,77 (0,42)	6,28 (0,24)	6,22 (0,19)
	35	5,08 (0,38)	6,12 (0,23)	6,08 (0,17)
P	25	5,12 (0,29)	6,18 (0,23)	6,15 (0,22)
	30	5,01 (0,25)	6,03 (0,18)	6,03 (0,25)
	35	4,88 (0,49)	6,02 (0,13)	6,01 (0,30)
Global <sup>a</sup>		4,98 (0,44)	6,10 (0,24)	6,09 (0,22)
VC (%) <sup>b</sup>		92	95	94
Superfície rugosa				
s/s	Controle	5,76 (0,42)	6,44 (0,25)	6,56 (0,33)
M	25	5,23 (0,23)	6,33 (0,45)	6,34 (0,18)
	30	5,11 (0,28)	6,17 (0,17)	6,14 (0,23)
	35	5,22 (0,25)	6,29 (0,14)	6,30 (0,34)
P	25	5,14 (0,24)	6,20 (0,38)	6,19 (0,16)
	30	5,24 (0,26)	6,38 (0,31)	6,34 (0,26)
	35	5,15 (0,29)	6,21 (0,26)	6,20 (0,25)
c/s	Controle	5,41 (0,19)	6,41 (0,29)	6,46 (0,32)
M	25	5,17 (0,24)	6,25 (0,26)	6,25 (0,17)
	30	4,98 (0,43)	6,08 (0,25)	6,06 (0,49)
	35	5,22 (0,35)	6,29 (0,31)	6,26 (0,27)
P	25	5,13 (0,20)	6,20 (0,16)	6,18 (0,24)
	30	5,14 (0,32)	6,21 (0,17)	6,20 (0,10)
	35	5,07 (0,57)	6,17 (0,20)	6,10 (0,18)
Global <sup>a</sup>		5,15 (0,32)	6,23 (0,27)	6,21 (0,26)
VC (%) <sup>b</sup>		92	97	96

<sup>a</sup>Agrupando por tipo de superfície. <sup>b</sup>Viabilidade celular em relação ao controle

Nota: A anova acusou somente média global de superfície lisa maior do que a média global de rugosa para todos os microrganismos ( $p \leq 0,001$ ).

Figura 21 – Média amostral (coluna) de logaritmo de ufc/mL e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical) relativos à *Cândida albicans*, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

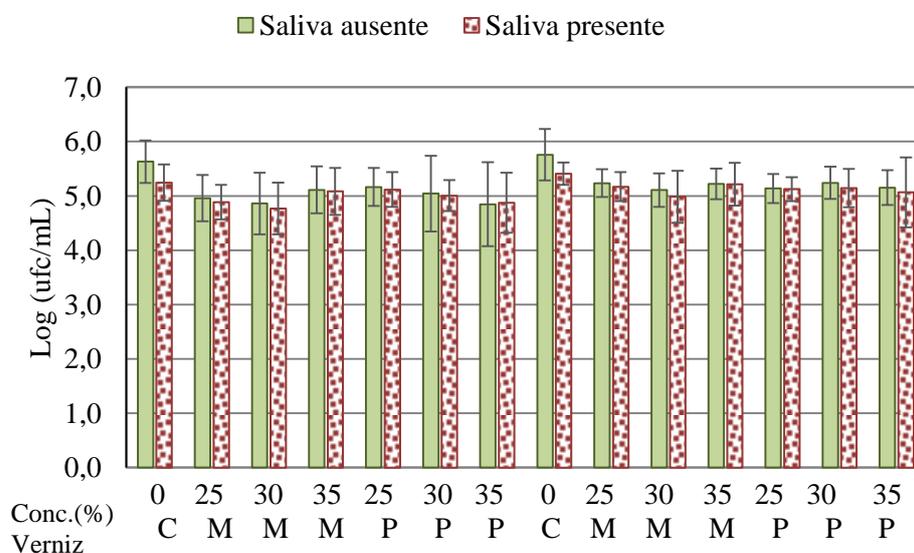


Figura 22 – Média amostral (coluna) de logaritmo de ufc/mL e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical) relativos à *Cândida glabrata*, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

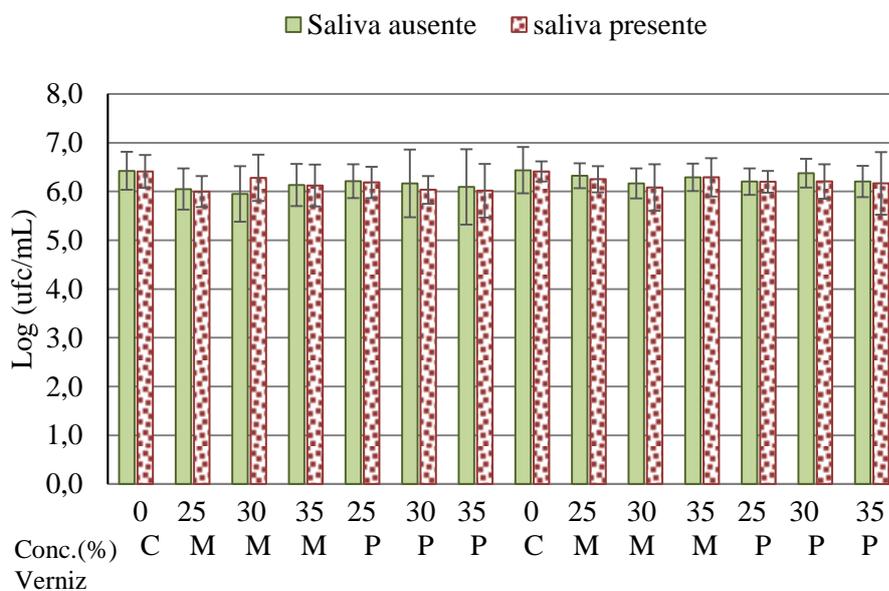
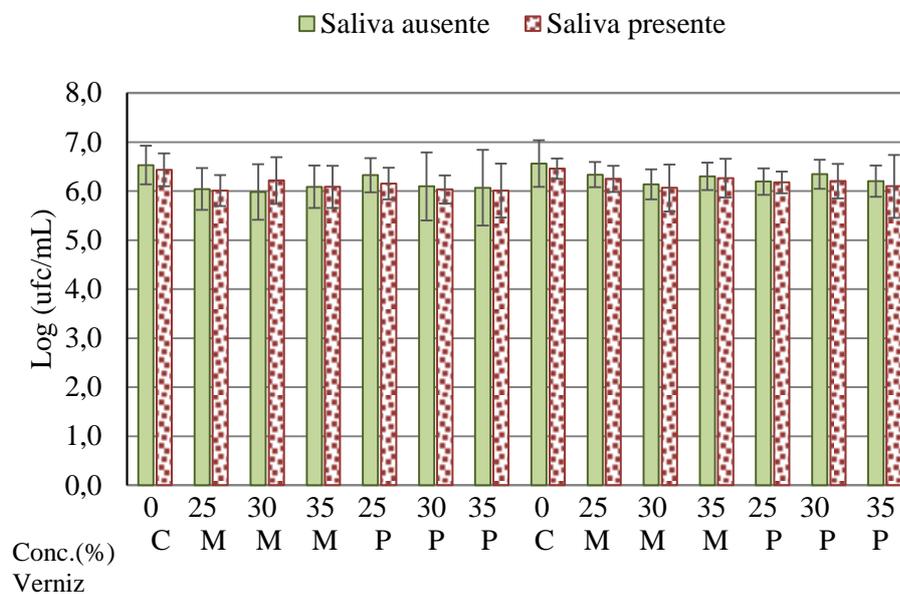


Figura 23 – Média amostral (coluna) de logaritmo de ufc/mL e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical) relativos ao *Streptococcus mutans*, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.



#### 5.4 Formação do biofilme multiespécies

Na Tabela 4 são exibidas as médias e desvios padrão de absorbâncias determinadas pelo método XTT no estudo da formação de biofilme multiespécies (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*). Uma análise de variância de quatro fatores sobre as absorbâncias foi empregada para avaliar a formação de biofilme. O sumário desta análise, dado na Tabela A53 do Apêndice, sugere, ao nível de significância de 1%, efeito significativo dos fatores principais ( $p \leq 0,002$ ), da interação verniz x superfície ( $p < 0,001$ ) e da interação verniz x superfície x saliva ( $p = 0,009$ ). O teste de Tukey foi empregado para estudar essas indicações de significância com o resultado resumido na Tabela 4.

Pela Tabela 4, pode ser observado que houve diminuição nas médias de absorbância para a maioria dos grupos experimentais em comparação aos controles correspondentes, com exceção dos grupos M25 lisos com e sem saliva; P25 rugoso e sem saliva; P30 e P35 rugoso com e sem saliva. O metabolismo celular dos que receberam os vernizes, para a superfície lisa, ficou entre 65 a 79% em relação ao controle. Para este tipo de superfície, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais, exceto para o verniz M25 com saliva.

Para a superfície rugosa, as médias de absorvância relativa ao verniz P em todas as concentrações e sem a presença de saliva foram maiores, com o metabolismo celular na faixa de 94% a 97% em relação. Os demais metabolismos ficaram entre 79 a 83% do controle, mais próximas das porcentagens encontradas para a superfície lisa. Ainda, embora as médias dos grupos com saliva tenham sido, em geral, menores comparadas com as amostras sem saliva, houve significância deste efeito somente para os grupos P25 e P35.

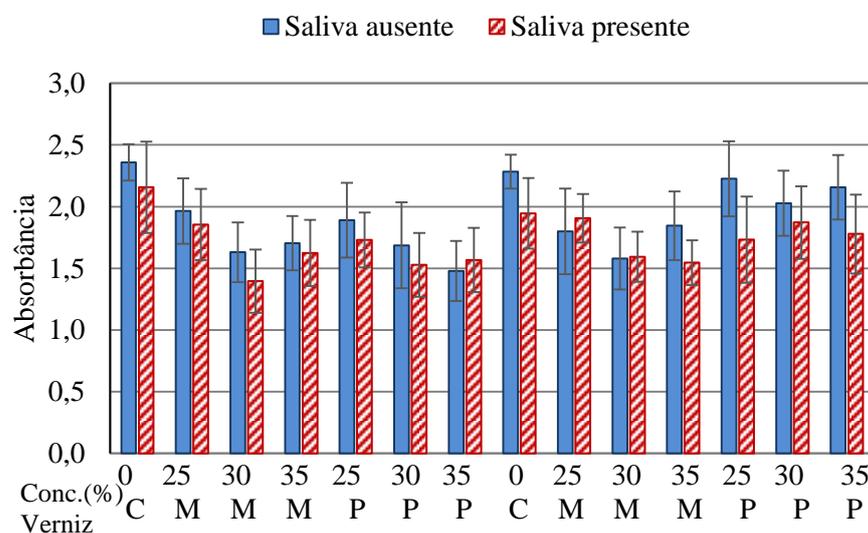
Na Figura 24 estão as representações gráficas das médias amostrais de absorvâncias, juntamente com intervalos de confiança de 99% para as médias populacionais. Esses dados permitem a visualização dos resultados obtidos, além de fornecerem a precisão sobre as médias.

Tabela 4 – Média (desvio padrão) de absorvâncias pelo método XTT, para o teste de formação do biofilme multiespécies, de acordo com o tipo de superfície (lisa ou rugosa), ausência ou presença de saliva, tipo de verniz (M ou P). Araraquara 2013.

Superfície	Verniz Conc. (%)	s/saliva	VC (%) <sup>1</sup>	c/saliva	VC (%) <sup>1</sup>		
Lisa	Controle	2,36 (0,13) <sup>d</sup>	100	2,16 (0,33)	c	91	
	M	25	1,97 (0,24) <sup>abcd</sup>	83	1,86 (0,26)	bc	79
		30	1,63 (0,22) <sup>ab</sup>	69	1,40 (0,23)	a	59
		35	1,70 (0,20) <sup>ab</sup>	72	1,62 (0,24)	ab	69
	P	25	1,89 (0,27) <sup>abc</sup>	80	1,73 (0,20)	ab	73
		30	1,69 (0,31) <sup>ab</sup>	72	1,53 (0,23)	ab	65
		35	1,48 (0,22) <sup>a</sup>	63	1,57 (0,23)	ab	66
	Rugosa	Controle	2,28 (0,12) <sup>d</sup>	100	1,95 (0,26)	bc	85
		M	25	1,80 (0,31) <sup>abc</sup>	79	1,91 (0,18)	bc
30			1,58 (0,22) <sup>ab</sup>	69	1,59 (0,18)	ab	70
35			1,84 (0,25) <sup>abc</sup>	81	1,55 (0,16)	ab	68
P		25	2,23 (0,27) <sup>cd*</sup>	97	1,73 (0,31)	ab	76
		30	2,03 (0,24) <sup>abcd</sup>	89	1,87 (0,26)	bc	82
		35	2,16 (0,23) <sup>cd*</sup>	94	1,78 (0,29)	abc	78

<sup>1</sup>Metabolismo celular em relação ao controle. \*diferença significativa entre médias de saliva.  
Nota: Médias com letras iguais na coluna não são significativamente diferentes ao nível de 1%

Figura 24 – Média amostral (coluna) de absorvâncias e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical), para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.



Na Tabela 5 são dadas as médias e desvios padrão de logaritmos de ufc/mL para os três micro-organismos em estudo. Ao nível de significância de 1%, as três análises de variância (sumários nas Tabelas A54 a A56 do Apêndice) não evidenciaram qualquer efeito dos fatores em estudo sobre as contagens de ufc/mL. Somente se encontraram diferenças de médias em relação aos controles do micro-organismo *S. mutans*. Neste caso, as viabilidades celulares ficaram em torno de 86%, enquanto para os outros micro-organismos foram próximas do controle.

Nas Figuras 25 a 27 estão os gráficos as médias amostrais de logaritmos de ufc/ml, respectivamente, para os micro-organismos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Streptococcus mutans*. Como anteriormente, esses gráficos incluem intervalos de confiança de 99% para as médias populacionais.

Tabela 5 – Média (desvio padrão) de logaritmos de ufc/mL, para o teste de formação do biofilme multiespécies, de acordo com o tipo de superfície (lisa ou rugosa), ausência (s/s) ou presença (c/s) de saliva e tipo de verniz (M ou P). Araraquara 2013.

Verniz	Conc. (%)	Microrganismo		
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
<b>Superfície lisa</b>				
s/s	Controle	5,55 (0,46)	5,68 (0,49)	6,59 (0,49)
M	25	5,27 (0,41)	5,57 (0,43)	5,67 (0,57)
	30	4,88 (0,50)	5,53 (0,64)	5,74 (0,95)
	35	5,17 (0,62)	5,35 (0,35)	5,84 (0,49)
P	25	5,36 (0,33)	5,54 (0,48)	5,61 (0,42)
	30	5,09 (0,66)	5,40 (0,55)	5,68 (0,26)
	35	4,78 (0,63)	5,32 (0,44)	5,65 (0,48)
c/s	Controle	5,26 (0,43)	5,71 (0,36)	6,46 (0,55)
M	25	5,18 (0,47)	5,41 (0,52)	5,90 (0,60)
	30	5,14 (0,51)	5,47 (0,35)	5,57 (0,49)
	35	5,16 (0,52)	5,34 (0,41)	5,79 (0,49)
P	25	5,24 (0,28)	5,38 (0,39)	5,43 (0,27)
	30	4,94 (0,49)	5,14 (0,39)	5,16 (0,46)
	35	5,30 (0,42)	5,56 (0,41)	5,48 (0,82)
Global <sup>a</sup>		5,13 (0,50)	5,42 (0,46)	5,63 (0,56)
VC (%) <sup>b</sup>		95	95	86
<b>Superfície rugosa</b>				
s/s	Controle	5,61 (0,55)	5,75 (0,70)	6,70 (0,62)
M	25	5,38 (0,35)	5,60 (0,27)	5,64 (1,09)
	30	5,28 (0,36)	5,54 (0,73)	6,00 (0,75)
	35	5,30 (0,61)	5,34 (0,32)	5,68 (0,81)
P	25	5,51 (0,33)	5,60 (0,28)	5,96 (0,71)
	30	5,37 (0,33)	5,71 (0,59)	5,74 (0,26)
	35	5,31 (0,32)	5,74 (0,46)	5,78 (0,23)
c/s	Controle	5,35 (0,32)	5,52 (0,45)	6,61 (0,43)
M	25	5,20 (0,36)	5,27 (0,64)	5,53 (0,42)
	30	4,88 (0,60)	5,54 (0,61)	5,78 (0,55)
	35	5,13 (0,59)	5,51 (0,54)	5,64 (0,38)
P	25	5,31 (0,30)	5,47 (0,39)	5,61 (0,35)
	30	5,38 (0,36)	5,58 (0,38)	5,68 (0,45)
	35	5,29 (0,30)	5,50 (0,42)	5,59 (0,54)
Global <sup>a</sup>		5,28 (0,42)	5,53 (0,49)	5,72 (0,60)
VC (%) <sup>b</sup>		96	98	86 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Agrupando por tipo de superfície. <sup>b</sup>Viabilidade celular em relação ao controle. <sup>c</sup>Houve evidência de diminuição significativa de médias de contagens em relação aos controles do *S. mutans*.

Figura 25 – Média amostral (coluna) de logaritmo de ufc/mL e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical) relativos à *Cândida albicans*, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

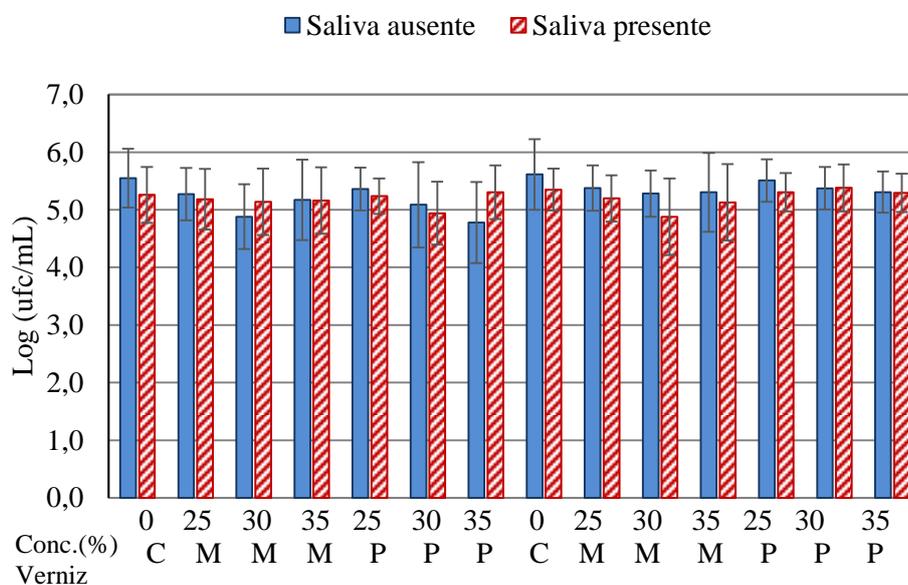


Figura 26 – Média amostral (coluna) de logaritmo de ufc/mL e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical) relativos à *Cândida glabrata*, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

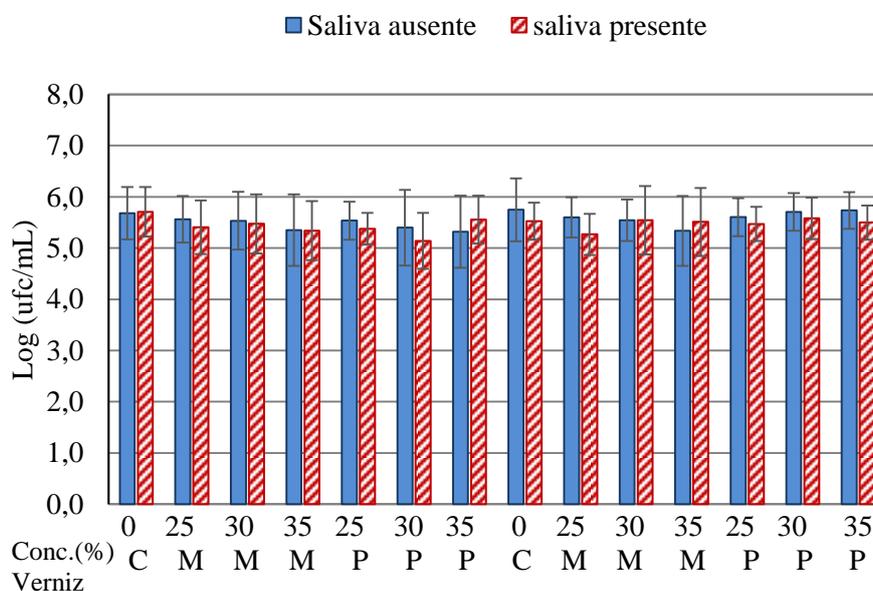
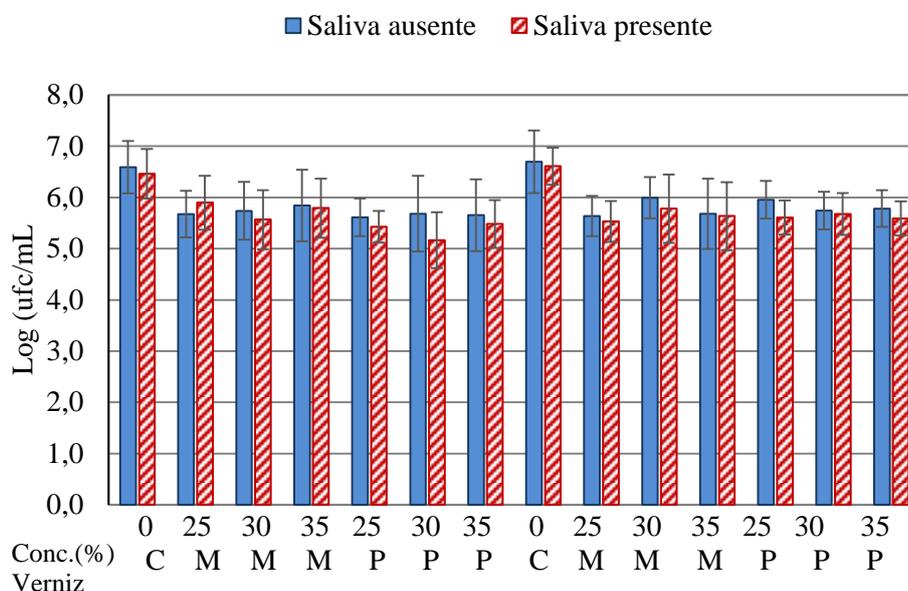


Figura 27 – Média amostral (coluna) de logaritmo de ufc/mL e intervalos de confiança de 99% para a média populacional (barra vertical) relativos ao *Streptococcus mutans*, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.



### 5.5 Escovação do biofilme multiespécies associada aos vernizes

A análise da efetividade da escovação na remoção do biofilme multiespécies foi realizada apenas por estatísticas descritivas, uma vez que todos os grupos experimentais apresentaram médias de dez a trinta vezes menores do que as do biofilme, inviabilizando uma análise de variância ou mesmo o cálculo efetivo de viabilidades celulares confiáveis. A média (desvio padrão) de absorbância (DO 492nm) para os grupos submetidos à escovação ficaram entre 0,08 (0,05) e 0,11 (0,04). As médias dos logaritmos de ufc/mL para as amostras submetidas à escovação foram todas iguais a zero, não sendo observado qualquer crescimento dos três micro-organismos.

### 5.5 Recolonização do biofilme multiespécies associada aos vernizes

Da mesma forma que na avaliação da efetividade da escovação na remoção do biofilme multiespécies, a avaliação da capacidade de recolonização do biofilme após a escovação, tanto para os valores de absorbância como para os logaritmos de ufc/mL, foi realizada por estatísticas descritivas. As médias e desvios padrão de absorbância (DO 492nm) obtidos nos grupos experimentais podem ser arredondados para valores

nulos, enquanto para os grupos controles positivos a média (desvio padrão) foi de 2,34 (0,22) para a superfície lisa e de 2,33 (0,19) para a superfície rugosa. Portanto, os metabolismos celulares dos grupos experimentais foram praticamente iguais a 0%, demonstrando que a escovação remove de forma definitiva o biofilme aderido nas superfícies tratadas com vernizes mesmo após a suplementação com nutrientes por 48 horas.

Por fim, quanto aos valores de ufc/mL, todos os grupos experimentais apresentaram contagens de micro-organismos iguais a zero, mostrando novamente eficiência dos tratamentos correspondentes na eliminação dos mesmos.



## *Discussão*

## 6 Discussão

Vernizes ou selantes são tradicionalmente utilizados nas superfícies protéticas e materiais restauradores para o recobrimento das imperfeições, gaps, fissuras e porosidades. A aplicação dos selantes promove uma barreira mecânica na redução da absorção de água e da solubilidade de componentes químicos, os quais são associados com a degradação do material através do aumento da rugosidade superficial e porosidade. Nesse contexto, com o objetivo de aumentar a longevidade das superfícies protéticas, vernizes, coatings ou sealers podem ser utilizados visando a proteção do material contra os estresses externos envolvidos em fatores mecânicos e químicos<sup>75</sup>. Além disso, o acúmulo de resíduos alimentares e formação de biofilmes microbianos podem ser reduzidos com o selamento superficial, uma vez que a superfície tende a ficar mais lisa<sup>75</sup>. Recentemente, o desenvolvimento de vernizes ou selantes com potencial antimicrobiano e antiaderente tem atraído grande interesse na comunidade científica<sup>2</sup>.

Considerando que os vernizes podem ser facilmente aplicados sobre as superfícies das próteses, este estudo avaliou a capacidade de dois vernizes fotopolimerizáveis experimentais na prevenção da adesão de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* e formação de biofilme multiespécies sobre uma resina para base de prótese. Além disso, o efeito da escovação associada aos vernizes na remoção e na recolonização do biofilme também foi investigado.

A aderência de micro-organismos e a subsequente formação de biofilmes patogênicos e oportunistas sobre as superfícies protéticas podem resultar no desenvolvimento de uma infecção na mucosa adjacente denominada estomatite protética. Esta patologia tem sido associada com a presença da *C. albicans* e, de fato, essa espécie tem sido isolada dos indivíduos com essa inflamação há mais de 20 anos<sup>117</sup>. Entretanto, estudos recentes apontam para um aumento no número de infecções causadas pelas espécies não-*albicans* (NCAC), especificamente *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*<sup>117</sup>. Esse achado é reforçado por estudos epidemiológicos nos quais as espécies NCAC tem sido associadas a cerca de 60% da fungemia<sup>116</sup>. Em uma revisão de literatura recente, Silva et al.<sup>117</sup> (2011) relataram que *C. glabrata* é considerada uma saprófita relativamente não patogênica da flora de indivíduos saudáveis e não está associada com infecções sérias. Entretanto, essa espécie pode disseminar-se rapidamente ao longo do corpo, e atualmente tem sido

associada a elevadas taxas de mortalidade. Além disso, *C. glabrata* tem gerado certa preocupação devido a sua resistência a certos agentes antifúngicos. Estudos tem demonstrado que biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. glabrata* tendem a aumentar a taxa de sobrevivência dos micro-organismos por meio da ação da atividade sinérgica entre as espécies<sup>96</sup>.

Além das espécies do gênero *Candida*, outros micro-organismos podem ser encontrados na superfície das próteses, tais como o *S. mutans*<sup>9</sup>. Estudos envolvendo a formação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans* tem demonstrado que a bactéria pode facilitar a aderência das espécies fúngicas como *C. albicans*, devido à estimulação do crescimento mútuo entre esses micro-organismos, além da possibilidade dos mesmos co-agregarem-se, aumentando o processo de adesão. Dessa forma, neste estudo foram utilizados, conjuntamente, os micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* com a finalidade de obter condições experimentais in vitro mais próximas do que ocorre in vivo.

Vários métodos podem ser utilizados na determinação da aderência microbiana sobre as superfícies e a comparação entre eles é difícil, uma vez que analisam diferentes aspectos e apresentam limitações variadas<sup>69</sup>. Neste estudo, os métodos utilizados para a mensuração da quantidade de micro-organismos aderidos foram o XTT e UFC. Tem sido relatado que o ensaio do XTT, o qual é um método colorimétrico semi-quantitativo baseado na atividade metabólica das células<sup>139</sup>, pode ser relacionado com outras técnicas quantitativas como UFC<sup>100, 57</sup>. Entretanto, é importante salientar que a mensuração da atividade metabólica por meio do ensaio do XTT pode ser influenciado pelo estado metabólico das células, por exemplo, pode variar entre as células em seu estado planctônico e em biofilmes. Por outro lado, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), embora mais trabalhosa e demorada, não é significativamente afetada pelo estado metabólico das células e enumera, diretamente, a quantidade celular<sup>57, 96</sup>.

Embora o método XTT seja rotineiramente empregado para quantificar, através do metabolismo celular, os biofilmes de *Candida* ou de células eucarióticas<sup>25, 57, 61</sup>, é possível sua aplicação em outros biofilmes, especialmente os bacterianos, como o de *S. mutans*<sup>1, 19, 39</sup>. No ensaio de XTT, são utilizado vários aditivos que atuam como carregadores de elétrons, sendo que, para o gênero *Candida*, o aditivo padrão é a menadiona<sup>58</sup>. Esse mesmo aditivo também pode ser utilizado para bactérias e cocos gram positivos<sup>1</sup>. Por meio desse teste, a atividade microbiana é mensurada,

indiretamente, através da avaliação da atividade do sistema de transporte de elétrons (STE). Nesse STE são necessários receptores de elétrons artificiais, isto é, corantes redóx que competem por elétrons com o oxigênio. O XTT é reduzido pelas enzimas desidrogenases presentes no STE dos micro-organismos em corante formazano solúvel em água, e a absorbância pode ser medida pelo espectrofotômetro<sup>1</sup>. Jin et al.<sup>57</sup> (2004) relataram que a maior vantagem do ensaio XTT é que não é necessária a remoção das células do substrato, o que poderia induzir a perda no número de células total. Segundo esses autores, isso é especialmente aplicado na fase de aderência do biofilme, onde o número de células é relativamente pequeno. Embora alguns estudos tenham relatado que o ensaio de XTT pode ser utilizado para a comparação de condições envolvendo somente uma espécie fúngica<sup>96</sup>, outros estudos utilizaram a análise de XTT para a mensuração da atividade metabólica total de biofilmes mistos<sup>52</sup>.

Os mecanismos da adesão de micro-organismos e formação do biofilme sobre as superfícies protéticas é similar ao que ocorre nos substratos dentais, como esmalte ou dentina<sup>75</sup>. Quando a higienização diária é deficiente, as superfícies protéticas ficam sujeitas à retenção de restos alimentares e ao acúmulo de micro-organismos, o que pode resultar em inflamação da mucosa que está em contato com a prótese, gosto e odor desagradáveis. A formação do biofilme depende de uma interação complexa de variáveis, incluindo as características superficiais (textura, energia de superfície, porosidade), tipo do micro-organismo colonizador e propriedades salivares<sup>48, 68, 69, 75, 84, 121, 129</sup>. Nesse aspecto, a prótese dentária é constituída por uma superfície polida e lisa, que mantém contato com a mucosa jugal e outra não polida e rugosa, correspondente a parte interna em contato com o palato. Alguns autores<sup>48, 69, 84, 121, 129</sup> tem sugerido que o aumento da rugosidade pode contribuir para a retenção de micro-organismos. Lazarin et al.<sup>69</sup> (2012) relataram que a rugosidade média (Ra) é o parâmetro mais universalmente utilizado para mensurar a rugosidade e é definido como a orientação média do contorno da superfície em torno de uma linha central. Os autores relataram também que o aumento da retenção microbiana pode estar diretamente relacionado com o aumento da rugosidade superficial, uma vez que as irregularidades da superfície tendem a aumentar a interface microorganismo/material. Ainda, o tamanho dos micro-organismos foi sugerido como fator contribuinte para a retenção microbiana.

Neste estudo, dois tipos de superfície foram avaliadas: lisa e rugosa. Os corpos-de-prova processados permitiram a obtenção de valores de rugosidade superficial bem

distintos, além de simular as duas superfícies das próteses totais. A rugosidade média para os grupos de superfície lisa foi de 0,17  $\mu\text{m}$ , enquanto a média dos valores de rugosidade para as amostras rugosas foi de 3,45  $\mu\text{m}$ . Esses valores são menores dos relatados por Richmond et al.<sup>104</sup> (2004) que observaram valores médios de rugosidade que variaram entre 1,36 a 9,43  $\mu\text{m}$  e Zissis et al.<sup>142</sup> (2000) que avaliaram a rugosidade superficial de resinas acrílicas termopolimerizáveis, fotopolimerizáveis, polimerizadas por energia de micro-ondas ou autopolimerizáveis (reembasadores rígidos ou resilientes). Os resultados obtidos por Zissis et al.<sup>142</sup> (2000) revelaram que a rugosidade dos materiais variou entre 0,7 a 7,6  $\mu\text{m}$ , sendo que para a resina acrílica polimerizada por micro-ondas a rugosidade ficou entre 6,8 a 7,6  $\mu\text{m}$ . De acordo com Verran, Maryan<sup>127</sup> (1997), superfícies com rugosidade acima de 1,26  $\mu\text{m}$  tendem a promover maior adesão de micro-organismos e, células grandes, tais como as fúngicas, são mais facilmente deslocadas de superfícies lisas comparadas às bactérias pequenas. Ainda, Radford et al.<sup>100</sup> (1998) relataram que as superfícies rugosas apresentaram maior formação de biofilme, devido à maior área de superfície ou, ainda, porque os organismos estão protegidos dos efeitos de limpeza ou da ação da saliva. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo revelaram que a utilização de corpos-de-prova com superfícies lisas ou rugosas, em geral, não diferiram estatisticamente para todos os testes de efetividade avaliados (adesão, biofilme, escovação e recolonização). Esses resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos recentes<sup>84, 87, 137, 138</sup> nos quais a rugosidade não promoveu influência significativa na aderência de *C. albicans*. Ainda, Zamperini et al. (2010)<sup>137</sup> e Zamperini et al. (2011)<sup>138</sup> sugeriram que outros estudos devem ser realizados utilizando amostras com diferentes superfícies, a fim de cobrir uma vasta gama de valores de rugosidade, com a finalidade de avaliar a contribuição real da rugosidade na adesão e consequente formação de biofilme.

A aplicação dos vernizes experimentais resultou, em geral, na ausência de diferenças significantes entre superfícies lisas e rugosas. Uma possível explicação para esses achados é que, após a aplicação dos vernizes, as superfícies tornem-se mais regulares, uma vez que a camada de verniz recobre as irregularidades e porosidades das superfícies, deixando as superfícies lisas e rugosas com rugosidades próximas umas das outras. Estudos futuros devem ser considerados para avaliar a rugosidade superficial antes e depois da aplicação dos vernizes.

O ensaio de XTT revelou, para todas as amostras que receberam os vernizes experimentais, lisos ou rugosos, valores de absorbância menores comparados com o

controle nos testes de adesão. Para o teste de formação de biofilme, essa afirmação é parcialmente verdadeira e válida para o verniz M, exceto para o verniz M25 com saliva, liso e rugoso. Já no verniz P, a formação do biofilme foi reduzida para a superfície lisa, com e sem saliva, e somente para o verniz P30 rugoso e com saliva. Ainda, a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) confirmou a redução dos micro-organismos dos grupos experimentais para os testes de adesão e formação de biofilme, embora não significativamente, exceto para o *S. mutans* no teste de formação do biofilme, cuja redução nos valores de ufc/mL foi significativa comparada ao controle. A análise de XPS demonstrou que as superfícies recobertas pelos vernizes apresentaram alterações na composição química, confirmando o recobrimento da superfície da resina acrílica. A porcentagem de carbono e oxigênio, para o verniz P foi, respectivamente, diminuída e aumentada, além de aparecer um pico de fósforo. Já para o verniz M, houve aumento na porcentagem de carbono, redução do oxigênio e ocorreu um pico de enxofre.

Tem sido relatada que a modificação da superfície com vernizes contendo grupos zwitteriônicos ou hidrofílicos pode prevenir a aderência de micro-organismos às superfícies de PMMA<sup>14, 20, 23, 54, 141</sup>. A sulfobetaina, um membro da família zwitteriônica frequentemente encontrada na natureza<sup>131</sup> e presente no verniz M, tem recebido grande atenção na comunidade científica por sua representatividade bem identificada na classe dos materiais poliméricos zwitteriônicos<sup>135</sup>, devido à sua compatibilidade com o sangue e na redução da adsorção de proteínas e aderência de micro-organismos<sup>43, 60, 74</sup>. Yuan et al.<sup>135</sup> (2003) relataram que os polímeros zwitteriônicos apresentam propriedades específicas como estrutura dipolar forte (aniônica e catiônica), conferida pelos seus grupos laterais, além de cadeias altamente rígidas e uma propriedade antipolielotrolítica única, isto é, os zwitteriônicos bloqueiam os sinais químicos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> que atraem os micro-organismos. Devido a essa natureza peculiar, especialmente, pela característica dipolar, os polímeros zwitteriônicos preservam uma carga total neutra<sup>69</sup>. A capacidade dos polímeros zwitteriônicos em reduzir a aderência de micro-organismos pode ainda estar relacionada com a sua habilidade de hidratação. As moléculas de água ligam-se, fortemente, à parte hidrofóbica do polímero através de solvatação iônica, originando uma camada de hidratação termodinâmica. Além disso, as longas cadeias e altas densidades moleculares destes polímeros também podem estar associadas com a redução da aderência microbiana. Dessa forma, a efetividade dos grupos zwitteriônicos

deve-se tanto à natureza química quanto à superfície da camada zwitteriônica<sup>20</sup>. Considerando essas características dos polímeros zwitteriônicos e dada a natureza negativamente carregada das células vivas, é possível atribuir à interação eletrostática entre o grupo carregado da sulfobetaina com os micro-organismos<sup>93</sup>. Klotz et al.<sup>59</sup> (1985) verificaram que fungos carregados positivamente tiveram sua capacidade de aderência aumentada em comparação com fungos carregados negativamente (in natura). Dessa forma, os autores constataram a existência das interações eletrostáticas repulsivas e sua ação na redução da aderência dos micro-organismos. Entretanto, Park et al.<sup>93</sup> (2003) relataram que essa interação eletrostática é secundária à ação das forças hidrofóbicas. Diante disso, pode ser sugerido que a capacidade da sulfobetaina em criar uma camada de hidratação extremamente forte e hidrofílica tende a reduzir ainda mais a adesão dos micro-organismos. Diante do exposto, essas explicações poderiam justificar a redução da adesão e formação do biofilme encontradas para o verniz M.

Para o verniz P, que contém polímeros hidrofílicos, a ligação entre as moléculas de água e o substrato ocorre através de ligações de hidrogênio<sup>20</sup>, que proporcionam a formação de uma “barreira” de água em torno do material<sup>14</sup>. Além da superfície de hidratação, a prevenção da adsorção de proteínas também pode ocorrer através do controle das propriedades físicas da superfície, como a rugosidade, pois a superfície tende a ficar mais lisa e hidrofílica<sup>141</sup>. Zhao et al.<sup>141</sup> (2010) relataram que o hidroxipropil metacrilato (HPMA) é um monômero neutro rico em radicais hidroxila, os quais podem ser funcionalizados via estér, conferindo uma dupla funcionalidade estrutural. Essa característica tende a aumentar, consideravelmente, seu potencial em aplicações biomédicas, uma vez que a modificação superficial tende a impedir a interação físico-química entre as proteínas e as superfícies. Dessa forma, é possível sugerir que a associação conjunta entre a formação da superfície de hidratação e a ação dos vernizes sobre as características superficiais da resina acrílica, uniformizando a superfície, poderiam ter induzido a redução na adesão e formação do biofilme multiespécies.

Com base nos aspectos apresentados é possível afirmar que os resultados encontrados são semelhantes a outros estudos que também relataram uma redução na adesão de *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* por polímeros zwitteriônicos ou hidrofílicos<sup>20, 68, 69, 74, 131</sup>. Recentemente, Lazarin et al.<sup>68, 69</sup> (2012 e 2013) avaliaram a efetividade de quatro vernizes fotopolimerizáveis experimentais (S, HP, HE e T), com diferentes concentrações (25, 30 e 35%), na redução da

hidrofobicidade e adesão de *C. albicans* sobre uma resina de base de prótese (Vipi Wave). Os resultados demonstraram que dois vernizes (S e HP) promoveram a redução da aderência de *Candida albicans* sobre a superfície da resina acrílica polimerizada em micro-ondas. Os autores associaram os resultados encontrados à modificação da superfície promovida pelos vernizes, embora não tenham sido observadas diferenças significantes na hidrofobicidade das mesmas.

Tendo em vista que a adesão de micro-organismos e consequente formação do biofilme às superfícies protéticas pode ser influenciada por diversos fatores, dentre os quais a película salivar<sup>13, 68, 69, 123, 136, 137, 139</sup>, metade dos corpos-de-prova de todas as condições experimentais realizadas nesse estudo foram submetidos à pré-incubação em saliva por 30 minutos. Os resultados demonstraram que a película salivar não promoveu efeito significativo para o teste de adesão dos micro-organismos, tanto para o ensaio de XTT como para a contagem de colônias, porém, a saliva promoveu, redução da formação do biofilme multiespécies, observada pelo ensaio de XTT, mas não para UFC.

A saliva é uma secreção exócrina produzida por diferentes glândulas e consiste de água, eletrólitos e proteínas<sup>139</sup>. A interação adesiva entre as leveduras e bactérias da cavidade bucal depende, entre outros fatores, da presença de proteínas salivares específicas, como mucinas, proteínas ricas em prolina e cálcio, que atuam como uma ponte molecular na mediação da adesão microbiana sobre a superfície de resina<sup>79</sup>. Além da ação das proteínas salivares, a presença de receptores específicos na película salivar, como a albumina, e a presença de água e nutrientes também podem favorecer a adesão dos micro-organismos<sup>139</sup>. No entanto, a saliva também possui propriedades antimicrobianas devido a presença de moléculas de defesa, tais como os anticorpos e proteínas capazes de bloquear os locais de adesão presentes nos substratos<sup>137</sup>. Além dos fatores relacionados à própria composição da saliva é importante considerar, ainda, a interação entre a película salivar e o substrato. Tem sido relatado que a natureza dos substratos influencia a composição da película adquirida, e consequentemente, a aderência inicial<sup>69</sup>. Por outro lado, a saliva também pode promover alteração nas características superficiais dos substratos, como a rugosidade e a hidrofobicidade. Contraditoriamente, tem sido relatado também que as propriedades superficiais do substrato podem ser transferidas através da película salivar, e, então, influenciar a adesão microbiana<sup>137</sup>. Dessa forma, a literatura científica não é clara acerca do efeito da saliva na adesão microbiana e essa divergência pode estar

relacionada com diferenças na coleta de saliva e sua manipulação<sup>93</sup>. Zamperini et al.<sup>137</sup> (2010) avaliaram o efeito de diferentes períodos de pré-condicionamento salivar (30 minutos, 1, 3 ou 12 horas) sobre a adesão de *C. albicans* em amostras lisas de uma resina para base de prótese polimerizada por energia de micro-ondas. Os autores verificaram que os períodos de pré-condicionamento avaliados não promoveram efeito significativo sobre a adesão de *C. albicans*. Para os autores, vários são os fatores que podem regular o efeito da saliva sobre a adesão microbiana, dentre os quais os diferentes períodos de condicionamento e a técnica de processamento da saliva. Dentro desse contexto, os autores relataram que a saliva esterilizada por filtração utilizada no estudo, embora tenha sido processada para produzir resultados mais reprodutíveis, pode ter promovido a remoção de algumas proteínas complexas envolvidas na adesão microbiana. Ainda, os autores observaram que, em geral, os estudos que encontraram um aumento na colonização microbiana após a incubação em saliva utilizaram testes de monitoramento de pH do meio, análises de adenosina trifosfatada e o ensaio de XTT, enquanto que, quando a quantificação é realizada pela microscopia ou pela contagem das unidades formadoras de colônias, a maioria dos estudos relata a ausência de efeito da saliva ou a redução da adesão. Isso sugere que os resultados controversos também podem estar, ao menos parcialmente, relacionados aos diferentes testes de adesão utilizados. Com base nesses achados, os autores sugeriram que o efeito da saliva na adesão de micro-organismos e desenvolvimento do biofilme não devem ser avaliados por um único método. Neste estudo, para a quantificação celular através da contagem de colônias, foi verificado que a saliva não promoveu efeito significativo sobre a adesão e sobre a formação do biofilme multiespécies. Essa mesma ausência de efeito foi verificada para o ensaio de XTT na adesão dos micro-organismos, mas não para a formação do biofilme, onde a pré-incubação em saliva, em geral, promoveu menores valores de absorbância comparados com as amostras não condicionadas, sendo significativa para os grupos P25 e 35% rugosos. Uma possível explicação para esse achado é que a saliva pode desempenhar diferentes papéis na adesão dos micro-organismos ao substrato, especialmente para o gênero *Candida*, dependendo da fase morfológica do mesmo, isto é, aumentando a adesão aos substratos quando na forma de leveduras ou reduzindo a adesão das células germinativas (forma filamentosa - hifas)<sup>36</sup>. San Millán et al.<sup>110</sup> (2000) avaliaram o papel de saliva na adesão de *C. albicans* ao poliestireno. A ausência de saliva, promoveu aumento da adesão de *C. albicans* 3153 com a germinação. No entanto, a

presença de saliva aumentou a adesão ao poliestireno de *C. albicans* 3153 nas células sob a forma de levedura, mas diminuiu a adesão das células germinadas. A maior adesão nas células sob a forma de levedura foi confirmada pela utilização de uma cepa agerminada.

As técnicas de XTT e UFC utilizadas neste estudo são frequentemente utilizadas para a avaliação da adesão ou formação de biofilmes<sup>22,57, 89, 116</sup>, sendo que, em geral, há estreita correlação entre os métodos<sup>22, 57</sup>. A comparação entre os dois métodos para este estudo demonstrou que a mensuração de UFC não detectou a redução da aderência e formação do biofilme multiespécies, conforme foi observado para o XTT. Esse achado está de acordo com o encontrado por Silva et al.<sup>116</sup> (2010). Os autores avaliaram, in vitro, a atividade metabólica de biofilmes formados por diferentes isolados clínicos de espécies não-*albicans* (NCAC). A atividade metabólica total dos biofilmes da *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi determinada pelo ensaio de redução XTT, e o número de células cultiváveis foi também estabelecida pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados demonstraram que a atividade metabólica total do biofilme foi cepa e espécie dependentes. Ainda, embora a atividade metabólica total, determinada pelo ensaio de XTT tenha sido reduzida para *C. glabrata* em relação as outras espécies de *Candida*, foi observada significativamente maior número de células por unidade de área. O mesmo ocorreu para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* intra-cepas. Os autores relataram que a discrepância observada entre a atividade do biofilme total e o número de células cultiváveis tem implicações de suma importância para os estudos de biofilme, uma vez que é frequentemente assumido que as medições de atividade metabólica fornecem uma correlação suficiente com quantificação indireta dos mesmos. Esta situação pode ser aplicada quando se compara um único tipo de cepa sob diferentes condições ambientais, mas é problemática quando várias cepas e espécies são comparadas.

Além da avaliação dos vernizes experimentais na redução da adesão e formação do biofilme multiespécies, este estudo verificou a efetividade da escovação mecânica na remoção desse biofilme, bem como a capacidade do biofilme em recolonizar a superfície acrílica após a escovação. A literatura contém dados substanciais sobre os métodos de higienização de próteses disponíveis, os quais incluem escovação mecânica, imersão em agentes de limpeza ou a combinação de ambos<sup>24, 28, 29, 30, 94</sup>. A higienização mecânica com escova é o método mais rotineiramente utilizado devido à simplicidade de técnica, custo acessível e efetividade

na remoção do biofilme<sup>24, 29, 30, 55, 92, 94</sup>. Entretanto, alguns estudos relatam que a escovação é capaz de reduzir, mas não eliminar completamente o biofilme presente sobre a superfície da prótese<sup>5, 42, 63, 114</sup>. Paraskevas et al.<sup>92</sup> (2007) verificaram que a escovação removeu pelo menos 50% do biofilme aderido, sugerindo que a ação mecânica promovida pela escova é o fator primordial no processo de remoção do biofilme. Embora a higienização com escova e creme dental seja efetiva na remoção do biofilme aderido, tem sido demonstrado que a ação abrasiva do dentífrico pode resultar em desgaste e aumento da rugosidade superficial dos materiais de base de prótese e reembasamento<sup>55, 78</sup>. O aumento da rugosidade pode favorecer a adesão fúngica, favorecendo a colonização de microrganismos<sup>55, 94</sup>. Dessa forma, a utilização de agentes de limpeza menos abrasivos tem sido recomendada com a finalidade de eliminar as desvantagens dos dentífricos<sup>5, 81</sup>. Pellizzaro et al.<sup>94</sup> (2012) avaliaram o efeito da escovação mecânica, por 90 segundos, com diferentes agentes de limpeza na redução do metabolismo do biofilme de *C. albicans* in vitro. Os autores concluíram que a escovação com todos os agentes de limpeza (água destilada, creme dental, clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 1% e Polident) resultou em redução significativa (mais de 96%) no metabolismo do biofilme (absorbância) de *C. albicans*. Além disso, foi observado que o maior efeito na remoção do biofilme foi associado ao procedimento mecânico da escovação e que as soluções podem potencializar este efeito. Mais recentemente, Panariello<sup>89</sup> (2013) avaliaram a eficácia da escovação, por 10 segundos, com diferentes agentes de limpeza (água destilada, ácido peracético 0,2%, clorexidina 1%, solução com dentífrico 1:1, hipoclorito de sódio 1%, perborato de sódio) em reduzir a viabilidade de um biofilme multiespécies (*C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*) em uma resina de base de prótese polimerizada por energia de micro-ondas (Vipi-Wave) ou em uma resina autopolimerizável para reembasamento imediato (Tokuyama Rebase). Os métodos de avaliação do biofilme foram o XTT e UFC. Os autores verificaram que a escovação com todas os agentes de limpeza promoveram maior redução da viabilidade do biofilme comparado com a imersão somente, sendo que a porcentagem de redução do biofilme para a escovação foi acima de 92%. A imersão foi considerada tão eficiente somente para as soluções de ácido peracético e hipoclorito de sódio 1%, o que demonstrou o efeito da solução na ação antimicrobiana. Ainda, a escovação com água destilada promoveu a redução de cerca de 96% do biofilme multiespécies, para a resina Vipi Wave, bem como eliminou completamente as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*, conforme apontou a análise das

unidades formadoras de colônia. Para o *S. mutans*, a escovação com água não foi capaz de eliminar completamente o micro-organismo, provavelmente devido ao fato da escovação por 10 segundos remover o biofilme mais superficial formado por *Candida*, mas não o biofilme formado por *S. mutans*, o qual é primeiramente aderido ao substrato e que tende a ocupar as camadas mais basais do biofilme.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que a escovação com água e sabão de coco por 30 segundos (ou 30 ciclos de escovação) promoveu remoção quase completa do biofilme multiespécies, atingindo valores de porcentagem de redução em torno de 96% para o ensaio de XTT, concordando com os achados Pellizzaro et al.<sup>94</sup> (2012) e Panariello<sup>89</sup> (2013). Ainda, não foi encontrada diferença entre os grupos experimentais, demonstrando que a ação da escovação foi superior a possível ação dos vernizes experimentais. Pode-se sugerir que a remoção do biofilme multiespécies estaria relacionada à ação mecânica exercida pelo contato direto entre as cerdas da escova com o biofilme acumulado, bem como às forças de cisalhamento hidrodinâmicas da solução de água e sabão durante a escovação, promovendo sua ruptura mecânica<sup>94</sup>. Dessa forma, o biofilme pode ser mecanicamente desestruturado da superfície de resina acrílica. Ainda, a análise das unidades formadoras de colônias revelou ausência de crescimento para todos os micro-organismos. Este resultado difere do encontrado por Panariello<sup>89</sup> (2013), que observou que o *S. mutans* não foi completamente eliminado da superfície acrílica após a escovação. Entretanto, vale ressaltar que o tempo de escovação utilizado neste estudo (30 segundos ou 30 ciclos de escovação) foi maior que o tempo empregado por aquele autor (10 segundos ou 10 ciclos de escovação). É possível afirmar que períodos maiores de escovação sejam capazes de remover mais efetivamente as camadas mais profundas do biofilme, as quais são habitadas pelo *S. mutans*. A comparação entre as análises por XTT e UFC demonstraram que o XTT apresentou valores de viabilidade celular maiores que a UFC, onde nenhum micro-organismo foi encontrado. Essa diferença nos achados entre os métodos pode ser explicada devido ao fato que no procedimento de XTT a reação ocorre com o biofilme aderido à superfície do substrato, tendendo a atingir toda a camada do biofilme. Já para a determinação das unidades formadoras de colônias, é necessário remover o biofilme do substrato e realizar diluições seriadas, o que pode resultar em diferenças experimentais, uma vez que não é possível afirmar que todas as células foram removidas do substrato<sup>57</sup>. Ainda, Gobor et al.<sup>39</sup> (2011) relataram que o rompimento do biofilme causado pelas diluições seriadas e contagem de unidades

formadoras de colônias subsequente não é considerado confiável, já que não é possível confirmar que cada colônia é originada de uma única célula.

Com o objetivo de verificar se os resultados obtidos para a escovação associada aos vernizes nos permitiriam afirmar que esse procedimento é capaz de eliminar completamente o biofilme multiespécies, foi verificada a capacidade do biofilme em recolonizar a superfície acrílica após a escovação mecânica. Os resultados obtidos comprovaram nossas suspeitas, isto é, após a escovação e posterior fornecimento de nutrientes por 48 horas, tanto a análise por XTT quanto a contagem das unidades formadoras de colônias foram zeradas, o que traduz a ausência completa de microorganismos. Dessa forma, é possível afirmar que a escovação com água e sabão por 30 segundos (ou 30 ciclos de escovação) é capaz de remover completamente o biofilme multiespécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados com o objetivo de verificar a efetividade da escovação sobre outros modelos de biofilmes *in vitro* e ainda sobre as situações *in vivo*.

De maneira geral, todas as proposições deste estudo foram efetivas. Contudo estudos futuros são necessários no sentido de avaliar a rugosidade dos corpos-de-prova após a aplicação dos vernizes, suas possíveis interações proteicas com os microorganismos, bem como a avaliação da estrutura do biofilme multiespécies por microscopia confocal a laser. Adicionalmente, a avaliação da permanência dos vernizes após escovação seriada, sua citotoxicidade e genotoxicidade são algumas avaliações sugeridas para viabilizar sua aplicação clínica.

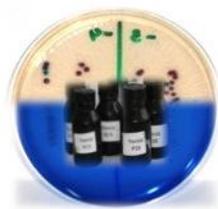


*Conclusão*

## 7 Conclusão

Dentro das limitações deste estudo podemos concluir que:

- 1 Os vernizes fotopolimerizáveis experimentais promoveram redução discreta da adesão dos micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*, para as amostras lisas e rugosas, independentemente da presença de saliva;
- 2 A formação do biofilme multiespécies foi discretamente reduzida pelos vernizes fotopolimerizáveis experimentais, sendo que a saliva tende a reduzir ainda mais essa formação;
- 3 O verniz M, nas maiores concentrações, obteve melhores resultados na redução da adesão e formação do biofilme multiespécies;
- 4 O tipo de superfície, lisa ou rugosa, em geral, não promoveu alterações na adesão e formação do biofilme multiespécies;
- 5 A escovação promoveu redução significativa no metabolismo do biofilme multiespécies (mais de 95%), para todos os grupos experimentais, tendo sido comprovada pelo teste de recolonização



## *Referências*

**Referências\***

1. Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods*. 2007; 68(1): 19-25.
2. Amano D, Ueda T, Sugiyama T, Takemoto S, Oda Y, Sakurai K. Improved brushing durability of titanium dioxide coating on polymethylmethacrylate substrate by prior treatment with acryloxypropyl trimethoxysilane-based agent for denture application. *Dent Mater J*. 2010; 29(1): 97-103.
3. Andrade JD, Hlady V, Wei AP. Adsorption of complex proteins at interfaces. *Pure Appl Chem* 1992; 64(11): 1777-81.
4. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10(1): 27-39.
5. Barnabé W, Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pregoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(5): 453-9.
6. Bissell V, Felix DH, Wray D. Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the treatment of denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993; 76(1): 35-9.
7. Brill N, Tryde G, Stoltze K, EL Ghamrawy EA. Ecologic changes in the oral cavity caused by removable partial dentures. *J Prosthet Dent*. 1977; 38(2): 138-48.
8. Bruinsma GM, van der Mei HC, Busscher HJ. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 2001; 22(24): 3217-24.
9. Brusca MI, Irastorza RM, Cattoni DI, Ozu M, Chara O. Mechanisms of interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: An experimental and mathematical modelling study. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4): 416-23.
10. Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Review. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48(1): 61-9.

---

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

11. Budtz-Jorgensen E, Knudsen AM. Chlorhexidine gel and Steradent employed in cleaning dentures. *Acta Odontol Scand.* 1978; 36(1): 83-7.
12. Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosth Dent.* 1979; 42(6): 619-23.
13. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010; 6(6): 2307-13.
14. Çagavi F, Akalan N, Celik H, Celik H, Gür D, Güçiz B. Effect of hydrophilic coating on microorganism colonization in silicone tubing. *Acta Neurochir* 2004; 146(6): 603–10.
15. Carlsson GE, Hedegard B, Koivumaa KK. Studies in partial dental prosthesis. IV. Final results of a 4-year longitudinal investigation of dentogingivally supported partial dentures. *Acta Odontol.* 1965; 23(5): 443-72.
16. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903-8.
17. Chang Y, Chang WJ, Shih YJ, Wei TC, Hsiue GH. Zwitterionic sulfobetaine-grafted poly(vinylidene fluoride) membrane with highly effective blood compatibility via atmospheric plasma-induced surface copolymerization. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011; 3(4): 1228–37.
18. Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1995; 74(3): 309-13.
19. Chen Y, Wong RW, Seneviratne CJ, Hägg U, McGrath C, Samaranayake LP, et al. The antimicrobial efficacy of Fructus mume extract on orthodontic bracket: a monospecies-biofilm model study in vitro. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(1): 16-21.
20. Cheng G, Zhang Z, Chen S, Bryers JD, Jiang S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials* 2007; 28(29): 4192–9.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Review. Science.* 1999; 284(5418): 1318-22.

22. Cochis A, Fracchia L, Martinotti MG, Rimondini L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 113(6): 755-61.
23. Cringus-Fundeanu I, Luijten J, van der Mei HC, et al. Synthesis and characterization of surfacegrafted polyacrylamide brushes and their inhibition of microbial adhesion. *Langmuir* 2007; 23(9): 5120–6.
24. Cruz PC, Andrade IM, Peracini A, Souza-Gugelmin MC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Paranhos HF. The effectiveness of chemical denture cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(6): 668-73.
25. da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008; 19(4): 364-9.
26. Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J*. 1972; 133(3): 101-5.
27. Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970; 129(4): 151-6.
28. de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos HF, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and *mutans streptococci* in denture biofilm. *Gerodontology*. 2011; 28(4): 264-70.
29. de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos HF. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. *J Prosthodont*. 2012; 21(1): 2-6.
30. de Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on *Candida spp.* biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent*. 2011; 105(1): 51-8.
31. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont*. 2007; 16(6): 465-72.
32. Dyer D, Addy M, Newcombe RG. Studies in vitro of abrasion by different manual toothbrush heads and a standard toothpaste. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(2): 99-103.

33. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adherence of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun* 1993; 61(6): 2644–52.
34. EL Gharmravy, E. Quantitative changes in dental plaque formation related to removable partial dentures. *J. Oral Rehabil.* 1976; 3(2): 115-20.
35. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida spp.* and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(5): 1067-73.
36. Elguezabal N, Maza JL, Dorronsoro S, Pontón J. Whole saliva has a dual role on the adherence of *Candida albicans* to polymethylmetacrylate. *Open Dent J.* 2008; 2: 1-4.
37. Garcia LB, Bulla JR, Kotaka CR, Tognim MCB, Cardoso CL. Testes salivares e bacteriológicos para avaliação do risco de cárie. *RBAC.* 2009; 41(1): 69-76.
38. Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. *J Am Osteopath. Assoc.* 2001; 101(2): 92-4.
39. Gobor T, Corol G, Ferreira LE, Rymovicz AU, Rosa RT, Campelo PM, et al. Proposal of protocols using D-glutamine to optimize the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) assay for indirect estimation of microbial loads in biofilms of medical importance. *J Microbiol Methods.* 2011; 84(2): 299-306.
40. Gomes PN, da Silva WJ, Pousa CC, Narvaes EA, Del Bel Cury AA. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(11): 1274-81.
41. Hahnel S, Rosentritt M, Bürgers R, Handel G, Lang R. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 383-91.
42. Harrison Z, Johnson A, Douglas, WI. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(5): 460-7.

43. Hasegawa T, Iwasaki Y, Ishihara K. Preparation and performance of protein-adsorption-resistant asymmetric porous membrane composed of polysulfone/phospholipid polymer blend. *Biomaterials*. 2001; 22(3): 243-51.
44. Haselden CA, Hobkirk JA, Pearson GJ, Davies EH. A comparison between the wear resistance of three types of denture resin to three different dentifrices. *J Oral Rehabil*. 1998; 25(5): 335-9.
45. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006; 49(2): 80-4.
46. Heath JR, Davenport JC, Jones PA. The abrasion of acrylic resin by cleaning pastes. *J. Oral Rehabil*. 1983; 10(2): 159-75.
47. Henderson CW, Schwartz RS, Herbold ET, Mayhew RB. Evaluation of the barrier system, an infection control system for the dental laboratory. *J Prosthet Dent*. 1987; 58(4): 517-21.
48. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids Surf., B*. 2004; 33(3-4): 235-41.
49. Hirota K, Murakami K, Nemoto K, Miyake Y. Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett*. 2005; 248(1): 37-45.
50. Hoyle BD, Williams LJ, Costerton JW. Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infect Immun*. 1993; 61(2): 777-80.
51. International Standards Organization. ISO 1567 for denture base polymers. Geneva: ISO; 1998.
52. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Formation and quantification assay of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* mixed biofilm. *Rev Iberoam Micol*. 2012; 29(4): 214-22.

53. Ishihara K, Iwasaki Y, Ebihara S, Shindo Y, Nakabayashi N. Photoinduced graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on polyethylene membrane for obtaining blood cell adhesion resistance. *Coll Surf B: Biointerf.* 2000; 18(3-4): 325-35.
54. Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res.* 1998; 39(2): 323-30.
55. Izumida FE, Ribeiro RC, Giampaolo ET, Machado AL, Pavarina AC, Vergani CE. Effect of microwave disinfection on the surface roughness of three denture base resins after tooth brushing. *Gerodontology.* 2011; 28(4): 277-82.
56. James A, Beaudette L, Costerton W. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J Ind Microbiol.* 1995; 15(4): 257-62.
57. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(10): 789-98.
58. Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Sietmann R, Lademann J, Kramer A, Kocher T. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2012; 7(1): Doc06.
59. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; 50(1): 97-101.
60. Konno T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K. Preparation of nanoparticles composed with bioinspired 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer. *Biomaterials.* 2001; 22(13): 1883-9.
61. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 506-8.
62. Kulak Y, Akiran A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J. Prosthet. Dent.* 1994; 72(3): 283-8.
63. Kulak Y, Akiran A, Kazazoglu, E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J. Oral Rehabil.* 1997; 24(10): 788-90.

64. Lal K, Santarpia RP, Pollock JJ, Renner RP. Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an in vivo replica model system: Therapeutic efficacy of an oral rinse. *J Prosthet Dent.* 1992; 67(1): 72-7.
65. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53(2): 383-5.
66. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242(2): 345-51.
67. Latimer JM. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1977; 6(4): 340-2.
68. Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DM, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(1): 1-9.
69. Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an in vitro study. *Gerodontology.* 2012 July 30. doi: 10.1111/j.1741-2358.2012.00688.x. [Epub ahead of print]
70. Lewis AL, Cumming ZL, Goreish HH, Kirkwood LC, Tolhurst LA, Stratford PW. Crosslinkable coatings from phosphorylcholine-based polymers. *Biomaterials.* 2001; 22(2): 99-111.
71. Lima EMCX, Moura JS, Garcia RCMR, Del Bel Cury A. Avaliação dos materiais e métodos de higiene utilizados por pacientes usuários de próteses removíveis em atendimento na clínica da FOP – UNICAMP. *Rev. Odonto Ciência* 2004; 19(43): 90-5.
72. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1999; 81(2): 202-6;
73. Long SF, Clarke S, Davies MC, Lewis AL, Hanlon GW, Lloyd AW. Controlled biological response on blends of a phosphorylcholine-based copolymer with poly(butyl methacrylate). *Biomaterials.* 2003; 24(23): 4115-21.

74. Lowe AB, Vamvakaki M, Wassall MA, Wong L, Billingham NC, Armes SP, Lloyd AW. Well-defined sulfobetaine-based statistical copolymers as potential antibioadherent coatings. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52(1): 88-94.
75. Mainieri VC, Beck J, Oshima HM, Hirakata LM, Shinkai RS. Surface changes in denture soft liners with and without sealer coating following abrasion with mechanical brushing. *Gerodontology*. 2011; 28(2): 146-51.
76. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Review. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(1): 71-109.
77. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Review. *Caries Res*. 2004; 38(3): 204-11.
78. Mendonça MJ, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Weight loss and surface roughness of hard chairside reline resins after toothbrushing: influence of postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(3): 281-7.
79. 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.
80. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008; 17(4): 312-7.
81. Moffa EB, Giampaolo ET, Izumida FE, Pavarina AC, Machado AL, Vergani CE. Colour stability of relined dentures after chemical disinfection. A randomised clinical trial. *J Dent*. 2011; 39(3): 65-71.
82. Moller S, Sternberg C, Andersen B, Christensen B, Ramos L, Givskov M, et al. In situ gene expression in mixedculture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(2): 721-32.
83. Monsenego P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study 'in vivo'. *J Oral Rehabil*. 2000; 27(8):708-13.
84. Moura JS, Silva WJ, Pereira T, Cury AADB, Garcia RCMR. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 2006; 96(3): 205-11.

85. Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci* 2007; 115(1): 77–80.
86. Nakabayashi N, Williams DF. Preparation of non-trombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomaterials*. 2003; 24(13): 2431-5.
87. Nevzatoglu EU, Özcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Invest* 2007; 11(3): 231–6.
88. Nyvad B, Fejerskov O. Desenvolvimento, estrutura e pH da placa dental. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 2a ed. São Paulo: Santos; 1995. p. 412.
89. Panariello BHD. Eficácia da imersão e da escovação mecânica combinada com diferentes agentes de limpeza de próteses na redução da viabilidade de biofilme multiespécies. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.
90. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009; 18(5): 427-31.
91. Paranhos HFO, Malachias A, Pardini LC. Materiais para limpeza de dentaduras: revisão da literatura. *Rev Fac Odontol Lins* 1991; 4(2): 15-8.
92. Paraskevas S, Rosema NA, Versteeg P, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. The additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. *J Periodontol* 2007; 78(6): 1011-6.
93. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont*. 2003; 12(4): 249-54.
94. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J*. 2012; 23(5): 547-54.

95. Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(3): 341-8.
96. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, Crielaard W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(8): 755-64.
97. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2005; 93(3): 288-93.
98. Raab FJ, Taylor A, Bucher JA. Scanning electron microscopic examination of ultrasonic and effervescent methods of surface contaminant removal from complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1991; 65(2): 255-8.
99. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of phenotypically switched *Candida albicans* to denture base materials. *Int J Prosthodont.* 1998; 11(1): 75-81.
100. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(9): 2475-9.
101. Ramage G, Jose A, Coco B, Rajendran R, Rautemaa R, Murray C, Lappin DF, Bagg J. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111(4): 456-60.
102. Ribeiro RC. 2009. Efeito do tempo e da desinfecção por micro-ondas no desempenho clínico e na quantificação de micro-organismos de um reembasador rígido. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.
103. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. *J Dent.* 2009; 37(9): 666-72.

104. Richmond R, Macfarlane TV, Mccord JF. An evaluation of the surface changes in PMMA biomaterial formulations as a result of toothbrush/dentifricie abrasion. *Dent Mater.* 2004; 20(2): 124-32.
105. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial Coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Review. *Trends Microbiol.* 2003; 11(2): 94-100.
106. Rickard H, Stephen L, Laurence H, Clive B, Nicola H, Pauline H. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(7): 3644-50.
107. Rocha CGBB, Reis C, Pimenta FC. Contagem e identificação de micro-organismos na saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após higienização e bochecho com anti-sépticos. *RPT.* 2006; 35(2): 125-33.
108. Romeiro RS. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2001 [acesso em 2012 Mar 04]; 479. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/78452580/TECNICA-DE-MICROGOTA-PARA-CONTAGEM-DE-CELULAS>.
109. Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol.* 1980; 25(8-9): 611-5.
110. San Millán R, Elguezabal N, Regúlez P, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology.* 2000; 146(9): 2105-12.
111. Santarpia RP 3rd, Pollock JJ, Renner RP, Spiechowicz E. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. *J Prosthet Dent.* 1990; 63(4): 437-43.
112. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int. J. Prosthodont* 2005; 18(5): 392-8.
113. Sexson JC, Phillips RW. Studies on the effects of abrasives on acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1951; 1(4): 454-71.

114. Shay K. Denture hygiene: a review and update. Review. J Contemp Dent Pract. 2000; 1(2): 28-41.
115. Sigal GB, Mrksich M, Whitesides GM. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. J Am Chem Soc 1998; 120(14): 3464–73.
116. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. Curr Microbiol. 2010; 61(6): 534-40.
117. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Review. Trends Microbiol. 2011; 19(5): 241-7.
118. Souza RF, Regis RR, Nascimento C, Paranhos HF, Silva CH. Domestic use of a disclosing solution for denture hygiene: a randomised trial. Gerodontology. 2010; 27(3): 193-8.
119. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. Review. Lancet. 2001; 358(9276): 135-8.
120. Taira Y, Hatono H, Mizukane M, Tokita M, Atsuta M. Effect of ceramic coating by aerosol deposition on abrasion resistance of a resin composite material. Dent Mater J. 2006; 25(4): 700-5.
121. Tari BF, Nalbant D, Al DF, Kustimur S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. J Contemp Dent Pract. 2007; 8(1): 1-11.
122. Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. J Prosthet Dent. 1998; 80(5): 592-7.
123. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 2007; 52(12): 1200-8
124. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol. 2006; 51(8): 672–80.

125. Thein ZM, Smaranayake YH, Smaranayake LP. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS*. 2007; 115(11): 1241-51.
126. Tylenda CA, Larsen J, Yeh CK, Lane HC, Fox PC. High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. *J Oral Pathol Med*. 1989; 18(9): 520-4.
127. 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.
128. Verkaik MJ, Busscher HJ, Rustema-Abbing M, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC. Oral biofilm models for mechanical plaque removal. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(4): 403-9.
129. Waters MGJ, Williams DW, Jagger RG, Lewis MAO. Adherence of *Candida albicans* to experimental denture soft lining materials. *J Prosthet Dent*. 1997; 77(3): 306-12.
130. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida* associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J*. 1998; 43(3): 160-6.
131. West SL, Salvage JP, Lobb EJ, Armes SP, Billingham NC, Lewis AL, Hanlon GW, Lloyd AW. The biocompatibility of crosslinkable copolymer coatings containing sulfobetaines and phosphobetaines. *Biomaterials*. 2004; 25(7-8): 1195-204.
132. Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol*. 1978; 7(1): 82-3.
133. Wilson J. The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998; 185(8): 380-4.
134. Wolfaardt G, Lawrence J, Robarts R, Caldwell S, Caldwell D. Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(2): 434-66.
135. Yuan J, Zhang J, Zhu J, Shen J, Lin SC, Zhu W, Fang JL. Reduced platelet adhesion on the surface of polyurethane bearing structure of sulfobetaine. *J Biomater Appl*. 2003; 18(2): 123-35.

136. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2010; 55(10): 763-70.
137. Zamperini CA, Schiavinato PC, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effect of different periods of preconditioning with saliva on *Candida albicans* adhesion to a denture base resin by Crystal violet staining and XTT assay. J Investig Clin Dent. 2010; 1(2): 114-9.
138. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. Mycoses. 2011; 54(5): 344-51.
139. Zamperini CA, Schiavinato PC, Pavarina AC, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL. Effect of human whole saliva on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to a denture base acrylic resin: a focus on collection and preparation of saliva samples. J Investig Clin Dent. 2012 Dec 17. doi: 10.1111/jicd.12006. [Epub ahead of print]
140. Zarb GA, Mackay HF. The partially edentulous patient. I. The biologic price of prosthodontic intervention. Aust. Dent. J. 1980; 25(2): 63-8.
141. Zhao C, Li L, Zheng J. Achieving highly effective nonfouling performance for surface-grafted poly (HPMA) via atom-transfer radical polymerization. Langmuir 2010; 26(22): 17375–82.
142. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. Int J Prosthodont. 2000; 13(2): 136-40.
143. Zucco DL, Rossi B, Lopes AMCF, França PHC, Schubert EW. Efeito da clorexidina em gel ou dentifrício nos níveis salivares de estreptococos do grupo mutans em crianças do distrito do Saí. Rev Sul-Bras Odontol. 2010; 7(1): 27-34.



# *Apêndice*

## Apêndice

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os fins éticos e legais, que eu, (nome) \_\_\_\_\_, (nacionalidade) \_\_\_\_\_, portador do RG n. \_\_\_\_\_, C.P.F.n. \_\_\_\_\_ residente à \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, Aluno (4º ano da graduação ou Pós-graduação) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, concordo voluntariamente em participar da pesquisa intitulada **“Efetividade de vernizes fotopolimerizáveis experimentais e da escovação na redução da adesão de biofilme multi espécies em uma resina para base de prótese”**, sob responsabilidade da Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo e de sua orientada a cirurgiã-dentista e aluna de doutorado do programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Fernanda Emiko Izumida, que executará a pesquisa. Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1 – Fui devidamente esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo de testar diferentes vernizes experimentais de superfície e da escovação mecânica na redução da adesão de biofilme multi espécies em uma resina termopolimerizável para base de prótese. Fui também esclarecido que participarei voluntariamente dessa pesquisa restringindo-me à doação de saliva não estimulada, que será coletada em frascos estéreis, descartáveis e individuais. Estou ciente, portanto, que não haverá riscos ou benefícios relacionados a minha saúde. Eu fui informado pelos pesquisadores que a coleta de saliva (20 mL) será realizada no período da manhã após o desjejum e realização da higiene oral. Caso eu esteja com infecção orofaríngea (dor de garganta), gripe ou algum tipo de doença infecto-contagiosa serei dispensado da pesquisa. Eu fui informado que deverei dizer ao pesquisador no ato da coleta se estou utilizando algum medicamento que possa alterar as propriedades da minha saliva (antibiótico, antidepressivo, antiinflamatório, etc...).

2 – Fui esclarecido que durante qualquer procedimento da pesquisa serão seguidos todos os princípios de biossegurança durante os exames, ou seja, o operador estará protegido por meio da utilização de luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado.

3 – Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas à metodologia e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização ou prejuízo a minha pessoa em relação ao atendimento e/ou tratamentos futuros de que eu possa precisar junto à equipe da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

4 – Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; dos dados obtidos com a pesquisa. Recebi a garantia do sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

5 – Caso haja qualquer intercorrência odontológica durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar o pesquisador responsável, Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo, ou sua orientada a cirurgia-dentista Fernanda Emiko Izumida pelo telefone (16) 3301-6410.

6 – Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade de consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação adicional em relação a pesquisa da qual participo, pelo telefone (16) 3301-6432 ou 3301-6434.

Dessa forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, lido e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, ..... de ..... de 200...

\_\_\_\_\_  
Voluntário

\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo  
Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Fernanda Emiko Izumida  
Orientada

Tabela A1 – Composição (em milimol) dos vernizes experimentais. Araraquara, 2013.

Vernizes (Códigos)	Componentes					
	Metilmetacrilato (MMA)	TEGDMA	Bis - GMA	4-metil benzofenona (MPB)	HPMA (P)	Sulfobetaína (S)
P25	61,0	5,0	6,0	3,0	25,0	
P30	56,0	5,0	6,0	3,0	30,0	
P35	51,0	5,0	6,0	3,0	35,0	
M25	61,0	5,0	6,0	3,0		25,0
M30	56,0	5,0	6,0	3,0		30,0
M35	51,0	5,0	6,0	3,0		35,0

Tabela A2 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo controle. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
CL	Lisa	Ausente	0,10	0,20	0,17	0,20
CL	Lisa	Ausente	0,12	0,17	0,22	0,20
CL	Lisa	Ausente	0,13	0,12	0,21	0,14
CL	Lisa	Ausente	0,14	0,18	0,17	0,30
CL	Lisa	Ausente	0,05	0,20	0,19	0,27
CL	Lisa	Ausente	0,16	0,13	0,09	0,11
CL	Lisa	Ausente	0,13	0,09	0,21	0,28
CL	Lisa	Ausente	0,10	0,23	0,16	0,10
CL	Lisa	Ausente	0,10	0,26	0,23	0,19
CLS	Lisa	Presente	0,16	0,16	0,20	0,10
CLS	Lisa	Presente	0,15	0,15	0,25	0,13
CLS	Lisa	Presente	0,15	0,17	0,24	0,13
CLS	Lisa	Presente	0,18	0,17	0,10	0,06
CLS	Lisa	Presente	0,24	0,13	0,21	0,16
CLS	Lisa	Presente	0,14	0,26	0,17	0,11
CLS	Lisa	Presente	0,16	0,16	0,15	0,17
CLS	Lisa	Presente	0,20	0,23	0,11	0,09
CLS	Lisa	Presente	0,20	0,16	0,20	0,05

Tabela A3 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M25L	Lisa	Ausente	0,20	0,15	0,20	0,20
M25L	Lisa	Ausente	0,20	0,27	0,17	0,17
M25L	Lisa	Ausente	0,24	0,16	0,12	0,12
M25L	Lisa	Ausente	0,11	0,15	0,18	0,18
M25L	Lisa	Ausente	0,25	0,12	0,20	0,20
M25L	Lisa	Ausente	0,06	0,17	0,13	0,13
M25L	Lisa	Ausente	0,22	0,16	0,09	0,09
M25L	Lisa	Ausente	0,17	0,15	0,23	0,23
M25L	Lisa	Ausente	0,22	0,13	0,26	0,26
M25LS	Lisa	Presente	0,13	0,25	0,16	0,14
M25LS	Lisa	Presente	0,15	0,18	0,15	0,20
M25LS	Lisa	Presente	0,26	0,27	0,17	0,16
M25LS	Lisa	Presente	0,25	0,13	0,17	0,17
M25LS	Lisa	Presente	0,16	0,08	0,13	0,16
M25LS	Lisa	Presente	0,27	0,13	0,26	0,09
M25LS	Lisa	Presente	0,20	0,15	0,16	0,08
M25LS	Lisa	Presente	0,24	0,21	0,23	0,13
M25LS	Lisa	Presente	0,17	0,14	0,16	0,22

Tabela A4 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M30L	Lisa	Ausente	0,26	0,17	0,10	0,07
M30L	Lisa	Ausente	0,17	0,07	0,13	0,20
M30L	Lisa	Ausente	0,12	0,11	0,13	0,14
M30L	Lisa	Ausente	0,26	0,14	0,06	0,30
M30L	Lisa	Ausente	0,14	0,13	0,16	0,27
M30L	Lisa	Ausente	0,25	0,19	0,11	0,11
M30L	Lisa	Ausente	0,28	0,07	0,17	0,28
M30L	Lisa	Ausente	0,17	0,22	0,09	0,10
M30L	Lisa	Ausente	0,24	0,14	0,05	0,28
M30LS	Lisa	Presente	0,28	0,10	0,14	0,17
M30LS	Lisa	Presente	0,25	0,27	0,20	0,27
M30LS	Lisa	Presente	0,19	0,16	0,16	0,16
M30LS	Lisa	Presente	0,29	0,23	0,17	0,16
M30LS	Lisa	Presente	0,15	0,15	0,16	0,12
M30LS	Lisa	Presente	0,34	0,12	0,09	0,23
M30LS	Lisa	Presente	0,16	0,13	0,08	0,17
M30LS	Lisa	Presente	0,08	0,15	0,13	0,14
M30LS	Lisa	Presente	0,25	0,26	0,22	0,14

Tabela A5 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M35L	Lisa	Ausente	0,12	0,16	0,16	0,14
M35L	Lisa	Ausente	0,17	0,23	0,27	0,15
M35L	Lisa	Ausente	0,14	0,15	0,17	0,26
M35L	Lisa	Ausente	0,11	0,14	0,16	0,28
M35L	Lisa	Ausente	0,11	0,19	0,12	0,17
M35L	Lisa	Ausente	0,24	0,11	0,22	0,28
M35L	Lisa	Ausente	0,28	0,13	0,18	0,19
M35L	Lisa	Ausente	0,14	0,15	0,12	0,25
M35L	Lisa	Ausente	0,31	0,25	0,16	0,17
M35LS	Lisa	Presente	0,10	0,17	0,16	0,16
M35LS	Lisa	Presente	0,14	0,10	0,11	0,15
M35LS	Lisa	Presente	0,13	0,12	0,11	0,15
M35LS	Lisa	Presente	0,24	0,08	0,15	0,18
M35LS	Lisa	Presente	0,14	0,17	0,14	0,24
M35LS	Lisa	Presente	0,13	0,10	0,18	0,14
M35LS	Lisa	Presente	0,30	0,25	0,08	0,16
M35LS	Lisa	Presente	0,17	0,27	0,23	0,25
M35LS	Lisa	Presente	0,05	0,24	0,16	0,22

Tabela A6 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P25L	Lisa	Ausente	0,07	0,23	0,16	0,15
P25L	Lisa	Ausente	0,10	0,26	0,10	0,24
P25L	Lisa	Ausente	0,09	0,14	0,22	0,16
P25L	Lisa	Ausente	0,09	0,18	0,22	0,13
P25L	Lisa	Ausente	0,22	0,23	0,23	0,20
P25L	Lisa	Ausente	0,17	0,11	0,22	0,12
P25L	Lisa	Ausente	0,13	0,14	0,19	0,12
P25L	Lisa	Ausente	0,15	0,20	0,15	0,15
P25L	Lisa	Ausente	0,26	0,22	0,04	0,26
P25LS	Lisa	Presente	0,14	0,17	0,29	0,21
P25LS	Lisa	Presente	0,19	0,15	0,19	0,26
P25LS	Lisa	Presente	0,16	0,17	0,23	0,25
P25LS	Lisa	Presente	0,17	0,14	0,19	0,15
P25LS	Lisa	Presente	0,14	0,24	0,16	0,25
P25LS	Lisa	Presente	0,09	0,14	0,13	0,10
P25LS	Lisa	Presente	0,10	0,17	0,26	0,22
P25LS	Lisa	Presente	0,11	0,12	0,10	0,18
P25LS	Lisa	Presente	0,20	0,20	0,25	0,25

Tabela A7 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P30L	Lisa	Ausente	0,15	0,17	0,07	0,16
P30L	Lisa	Ausente	0,24	0,18	0,20	0,11
P30L	Lisa	Ausente	0,09	0,24	0,14	0,12
P30L	Lisa	Ausente	0,11	0,13	0,30	0,16
P30L	Lisa	Ausente	0,17	0,20	0,27	0,13
P30L	Lisa	Ausente	0,15	0,22	0,11	0,18
P30L	Lisa	Ausente	0,13	0,13	0,28	0,06
P30L	Lisa	Ausente	0,10	0,23	0,10	0,22
P30L	Lisa	Ausente	0,22	0,24	0,18	0,15
P30LS	Lisa	Presente	0,19	0,20	0,10	0,11
P30LS	Lisa	Presente	0,24	0,20	0,13	0,17
P30LS	Lisa	Presente	0,22	0,13	0,13	0,14
P30LS	Lisa	Presente	0,11	0,10	0,06	0,12
P30LS	Lisa	Presente	0,22	0,22	0,16	0,19
P30LS	Lisa	Presente	0,16	0,17	0,11	0,24
P30LS	Lisa	Presente	0,14	0,15	0,17	0,28
P30LS	Lisa	Presente	0,11	0,22	0,09	0,15
P30LS	Lisa	Presente	0,20	0,28	0,05	0,26

Tabela A8 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P35L	Lisa	Ausente	0,15	0,25	0,14	0,20
P35L	Lisa	Ausente	0,09	0,27	0,15	0,25
P35L	Lisa	Ausente	0,20	0,22	0,26	0,24
P35L	Lisa	Ausente	0,22	0,21	0,28	0,10
P35L	Lisa	Ausente	0,24	0,14	0,17	0,21
P35L	Lisa	Ausente	0,21	0,21	0,28	0,17
P35L	Lisa	Ausente	0,18	0,24	0,19	0,15
P35L	Lisa	Ausente	0,14	0,09	0,25	0,11
P35L	Lisa	Ausente	0,06	0,06	0,17	0,20
P35LS	Lisa	Presente	0,07	0,08	0,16	0,20
P35LS	Lisa	Presente	0,18	0,19	0,15	0,20
P35LS	Lisa	Presente	0,14	0,14	0,16	0,13
P35LS	Lisa	Presente	0,16	0,19	0,13	0,10
P35LS	Lisa	Presente	0,18	0,27	0,25	0,22
P35LS	Lisa	Presente	0,11	0,14	0,15	0,17
P35LS	Lisa	Presente	0,28	0,28	0,18	0,15
P35LS	Lisa	Presente	0,17	0,06	0,13	0,22
P35LS	Lisa	Presente	0,23	0,17	0,21	0,28

Tabela A9 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo controle. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
CR	Rugosa	Ausente	3,76	3,63	3,50	3,27
CR	Rugosa	Ausente	3,12	3,63	3,27	3,06
CR	Rugosa	Ausente	3,16	3,21	3,42	3,64
CR	Rugosa	Ausente	3,25	3,59	3,57	3,39
CR	Rugosa	Ausente	3,36	3,94	4,21	3,21
CR	Rugosa	Ausente	3,79	3,73	3,54	3,76
CR	Rugosa	Ausente	3,46	3,10	3,17	3,43
CR	Rugosa	Ausente	3,38	3,34	2,86	2,98
CR	Rugosa	Ausente	3,43	3,44	3,48	2,98
CRS	Rugosa	Presente	3,84	3,78	3,64	3,17
CRS	Rugosa	Presente	3,45	3,40	3,34	2,81
CRS	Rugosa	Presente	3,65	3,63	4,36	3,26
CRS	Rugosa	Presente	3,65	3,65	3,22	3,03
CRS	Rugosa	Presente	3,52	3,49	3,78	4,09
CRS	Rugosa	Presente	3,72	3,72	3,39	3,60
CRS	Rugosa	Presente	3,37	3,36	3,38	3,13
CRS	Rugosa	Presente	4,04	3,93	3,33	3,50
CRS	Rugosa	Presente	3,25	3,21	3,33	3,10

Tabela A10 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M25R	Rugosa	Ausente	3,15	3,56	4,07	3,63
M25R	Rugosa	Ausente	2,79	3,41	4,04	3,63
M25R	Rugosa	Ausente	3,28	3,75	3,49	3,21
M25R	Rugosa	Ausente	3,03	3,88	4,43	3,59
M25R	Rugosa	Ausente	3,88	4,27	3,48	3,94
M25R	Rugosa	Ausente	3,59	3,69	3,85	3,73
M25R	Rugosa	Ausente	3,11	3,41	3,68	3,10
M25R	Rugosa	Ausente	3,50	3,48	4,12	3,34
M25R	Rugosa	Ausente	3,10	3,08	2,95	3,44
M25RS	Rugosa	Presente	3,31	3,91	3,06	3,76
M25RS	Rugosa	Presente	3,53	3,25	4,20	3,12
M25RS	Rugosa	Presente	3,88	3,20	3,26	3,16
M25RS	Rugosa	Presente	3,80	3,75	3,67	3,25
M25RS	Rugosa	Presente	3,05	3,32	3,50	3,36
M25RS	Rugosa	Presente	3,25	3,48	3,92	3,79
M25RS	Rugosa	Presente	3,72	3,73	3,73	3,47
M25RS	Rugosa	Presente	3,53	3,53	4,04	3,34
M25RS	Rugosa	Presente	2,98	2,98	3,85	3,44

Tabela A11 – Médias de regosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M30R	Rugosa	Ausente	3,26	4,04	3,27	2,94
M30R	Rugosa	Ausente	3,05	4,04	3,06	3,40
M30R	Rugosa	Ausente	3,65	3,50	3,64	2,95
M30R	Rugosa	Ausente	3,39	4,45	3,39	3,22
M30R	Rugosa	Ausente	3,21	3,49	3,21	3,63
M30R	Rugosa	Ausente	3,75	3,84	3,76	3,24
M30R	Rugosa	Ausente	3,44	3,70	3,43	3,57
M30R	Rugosa	Ausente	2,97	4,15	2,98	3,37
M30R	Rugosa	Ausente	2,99	2,98	2,98	3,34
M30RS	Rugosa	Presente	2,94	3,06	2,97	3,53
M30RS	Rugosa	Presente	3,38	4,20	3,41	3,79
M30RS	Rugosa	Presente	2,91	3,27	2,94	4,17
M30RS	Rugosa	Presente	3,23	3,64	3,18	4,10
M30RS	Rugosa	Presente	3,63	3,50	3,62	4,11
M30RS	Rugosa	Presente	3,23	3,92	3,24	3,05
M30RS	Rugosa	Presente	3,55	3,74	3,58	3,56
M30RS	Rugosa	Presente	3,37	4,04	3,31	3,63
M30RS	Rugosa	Presente	3,34	3,84	3,32	3,94

Tabela A12 – Médias de regosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M35R	Rugosa	Ausente	3,00	3,29	3,00	3,33
M35R	Rugosa	Ausente	3,18	3,79	3,18	3,51
M35R	Rugosa	Ausente	3,45	4,09	3,46	3,55
M35R	Rugosa	Ausente	3,71	4,10	3,72	3,87
M35R	Rugosa	Ausente	3,83	4,10	3,84	3,37
M35R	Rugosa	Ausente	3,08	3,05	3,07	3,56
M35R	Rugosa	Ausente	3,26	3,56	3,26	3,48
M35R	Rugosa	Ausente	3,54	3,62	3,54	4,28
M35R	Rugosa	Ausente	3,05	3,93	3,05	4,14
M35RS	Rugosa	Presente	3,16	3,48	3,14	3,64
M35RS	Rugosa	Presente	3,43	3,30	3,41	3,34
M35RS	Rugosa	Presente	3,17	3,55	3,14	4,36
M35RS	Rugosa	Presente	3,64	3,73	3,66	3,22
M35RS	Rugosa	Presente	3,10	3,63	3,06	3,78
M35RS	Rugosa	Presente	3,12	3,17	3,09	3,39
M35RS	Rugosa	Presente	3,55	3,51	3,48	3,38
M35RS	Rugosa	Presente	3,06	3,47	3,06	3,33
M35RS	Rugosa	Presente	3,20	3,70	3,16	3,33

Tabela A13 – Médias de regosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P25R	Rugosa	Ausente	3,64	3,69	3,48	3,50
P25R	Rugosa	Ausente	3,34	3,27	3,30	3,27
P25R	Rugosa	Ausente	3,88	4,13	3,56	3,42
P25R	Rugosa	Ausente	3,22	3,63	3,73	3,57
P25R	Rugosa	Ausente	3,78	3,59	3,66	4,21
P25R	Rugosa	Ausente	3,39	3,39	3,15	3,54
P25R	Rugosa	Ausente	3,38	3,27	3,53	3,17
P25R	Rugosa	Ausente	3,33	3,67	3,50	2,86
P25R	Rugosa	Ausente	3,33	3,44	3,70	3,48
P25RS	Rugosa	Presente	2,96	3,54	3,69	2,84
P25RS	Rugosa	Presente	3,11	3,41	3,27	2,65
P25RS	Rugosa	Presente	3,20	3,48	4,13	3,06
P25RS	Rugosa	Presente	3,14	3,31	3,63	3,35
P25RS	Rugosa	Presente	3,66	3,50	3,59	3,76
P25RS	Rugosa	Presente	3,39	3,38	3,39	3,07
P25RS	Rugosa	Presente	3,65	3,76	3,27	3,78
P25RS	Rugosa	Presente	3,97	3,98	3,67	3,32
P25RS	Rugosa	Presente	3,51	4,28	3,44	3,03

Tabela A14 – Médias de regosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P30R	Rugosa	Ausente	3,00	3,32	3,54	3,91
P30R	Rugosa	Ausente	3,22	3,49	3,41	3,25
P30R	Rugosa	Ausente	3,75	3,53	3,48	3,20
P30R	Rugosa	Ausente	4,00	3,85	3,31	3,75
P30R	Rugosa	Ausente	3,18	3,38	3,50	3,32
P30R	Rugosa	Ausente	3,42	3,55	3,38	3,48
P30R	Rugosa	Ausente	3,18	3,49	3,76	3,73
P30R	Rugosa	Ausente	3,41	4,20	3,98	3,53
P30R	Rugosa	Ausente	3,82	4,15	4,28	2,98
P30RS	Rugosa	Presente	3,06	3,17	3,26	3,50
P30RS	Rugosa	Presente	3,24	3,55	3,47	3,27
P30RS	Rugosa	Presente	3,38	3,56	3,46	3,42
P30RS	Rugosa	Presente	3,34	3,51	2,95	3,57
P30RS	Rugosa	Presente	3,32	3,44	4,18	4,21
P30RS	Rugosa	Presente	3,31	3,27	3,48	3,54
P30RS	Rugosa	Presente	3,28	3,55	3,07	3,17
P30RS	Rugosa	Presente	2,82	2,81	2,77	2,86
P30RS	Rugosa	Presente	3,26	3,26	3,46	3,48

Tabela A15 – Médias de rugosidade superficial (Ra -  $\mu\text{m}$ ) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P35R	Rugosa	Ausente	3,09	2,83	3,09	4,04
P35R	Rugosa	Ausente	2,78	2,64	2,78	4,04
P35R	Rugosa	Ausente	3,12	3,02	3,12	3,50
P35R	Rugosa	Ausente	3,41	3,37	3,28	4,45
P35R	Rugosa	Ausente	3,60	3,78	3,60	3,49
P35R	Rugosa	Ausente	3,21	3,10	3,16	3,84
P35R	Rugosa	Ausente	3,57	3,76	3,56	3,70
P35R	Rugosa	Ausente	3,32	3,34	3,32	4,15
P35R	Rugosa	Ausente	3,04	3,01	3,03	2,98
P35RS	Rugosa	Presente	3,49	3,26	3,06	3,16
P35RS	Rugosa	Presente	3,27	3,47	3,23	3,43
P35RS	Rugosa	Presente	3,42	3,46	3,36	3,16
P35RS	Rugosa	Presente	3,57	2,95	3,35	3,64
P35RS	Rugosa	Presente	3,38	4,18	3,32	3,10
P35RS	Rugosa	Presente	3,54	3,48	3,30	3,13
P35RS	Rugosa	Presente	3,17	3,07	3,28	3,56
P35RS	Rugosa	Presente	2,87	2,77	2,81	3,07
P35RS	Rugosa	Presente	3,48	3,46	3,26	3,20

Tabela A16 – Médias (M) e desvios padrões (DP) de rugosidade, em Ra -  $\mu\text{m}$ , de acordo com o tipo de superfície (lisa ou rugosa), ausência ou presença de saliva, tipo de verniz (M ou P). Araraquara 2013.

Superfície	Verniz Conc. (%)	Adesão		Biofilme		Escovação		Recolonização		
		sem saliva	com saliva	sem saliva	com saliva	sem saliva	com saliva	sem saliva	com saliva	
Lisa	Controle	0,17 (0,06)	0,18 (0,04)	0,11 (0,03)	0,17 (0,03)	0,18 (0,04)	0,18 (0,05)	0,20 (0,07)	0,11 (0,04)	
	M	25	0,16 (0,04)	0,17 (0,06)	0,19 (0,06)	0,20 (0,05)	0,17 (0,06)	0,18 (0,04)	0,17 (0,06)	0,15 (0,05)
		30	0,14 (0,05)	0,17 (0,06)	0,21 (0,06)	0,22 (0,08)	0,11 (0,04)	0,15 (0,05)	0,19 (0,09)	0,17 (0,05)
		35	0,16 (0,05)	0,17 (0,07)	0,18 (0,08)	0,15 (0,07)	0,17 (0,05)	0,14 (0,04)	0,21 (0,06)	0,18 (0,04)
	P	25	0,19 (0,05)	0,17 (0,04)	0,14 (0,07)	0,14 (0,04)	0,17 (0,06)	0,20 (0,06)	0,17 (0,05)	0,20 (0,05)
		30	0,19 (0,04)	0,18 (0,05)	0,15 (0,05)	0,17 (0,05)	0,18 (0,08)	0,11 (0,04)	0,14 (0,05)	0,18 (0,06)
		35	0,19 (0,08)	0,17 (0,07)	0,16 (0,06)	0,17 (0,06)	0,21 (0,06)	0,17 (0,04)	0,18 (0,05)	0,18 (0,05)
	Rugosa	Controle	3,51 (0,27)	3,57 (0,23)	3,41 (0,24)	3,61 (0,24)	3,45 (0,36)	3,53 (0,36)	3,30 (0,28)	3,30 (0,38)
		M	25	3,61 (0,34)	3,46 (0,30)	3,27 (0,33)	3,45 (0,32)	3,79 (0,44)	3,69 (0,37)	3,51 (0,27)
30			3,80 (0,44)	3,69 (0,37)	3,30 (0,28)	3,29 (0,24)	3,30 (0,28)	3,29 (0,24)	3,29 (0,24)	3,76 (0,36)
35			3,72 (0,38)	3,50 (0,18)	3,34 (0,30)	3,27 (0,21)	3,34 (0,31)	3,24 (0,22)	3,68 (0,34)	3,53 (0,36)
P		25	3,56 (0,27)	3,62 (0,32)	3,48 (0,23)	3,40 (0,33)	3,51 (0,19)	3,56 (0,27)	3,45 (0,36)	3,20 (0,38)
		30	3,66 (0,33)	3,35 (0,25)	3,44 (0,34)	3,22 (0,18)	3,62 (0,32)	3,34 (0,41)	3,46 (0,30)	3,45 (0,36)
		35	3,21 (0,39)	3,34 (0,41)	3,24 (0,26)	3,35 (0,22)	3,22 (0,26)	3,22 (0,18)	3,80 (0,44)	3,27 (0,21)

Tabela A17 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo controle. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
CL	Lisa	Ausente	2,313	1,605	0,165	0,006
CL	Lisa	Ausente	2,390	1,838	0,066	0,013
CL	Lisa	Ausente	2,405	1,584	0,098	0,002
CL	Lisa	Ausente	2,633	2,019	0,110	0,017
CL	Lisa	Ausente	2,426	1,746	0,157	0,007
CL	Lisa	Ausente	2,259	2,183	0,129	0,005
CL	Lisa	Ausente	2,175	1,698	0,081	0,003
CL	Lisa	Ausente	2,266	1,647	0,043	0,002
CL	Lisa	Ausente	2,359	1,673	0,149	0,000
CLS	Lisa	Presente	1,813	1,852	0,124	0,009
CLS	Lisa	Presente	2,411	1,899	0,037	0,000
CLS	Lisa	Presente	2,505	1,601	0,113	0,005
CLS	Lisa	Presente	2,488	1,783	0,128	0,004
CLS	Lisa	Presente	2,205	1,377	0,057	0,007
CLS	Lisa	Presente	1,834	1,472	0,125	0,005
CLS	Lisa	Presente	1,749	1,765	0,055	0,000
CLS	Lisa	Presente	1,903	1,664	0,120	0,006
CLS	Lisa	Presente	2,506	1,714	0,083	0,003

Tabela A18 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M25L	Lisa	Ausente	2,282	0,916	0,104	0,004
M25L	Lisa	Ausente	1,884	1,075	0,119	0,002
M25L	Lisa	Ausente	1,828	1,055	0,068	0,004
M25L	Lisa	Ausente	2,201	1,244	0,134	0,001
M25L	Lisa	Ausente	2,195	1,404	0,134	0,007
M25L	Lisa	Ausente	2,078	1,466	0,033	0,001
M25L	Lisa	Ausente	1,723	1,390	0,116	0,005
M25L	Lisa	Ausente	1,904	0,935	0,067	0,005
M25L	Lisa	Ausente	1,590	1,065	0,108	0,007
M25LS	Lisa	Presente	1,925	0,767	0,096	0,006
M25LS	Lisa	Presente	2,071	0,811	0,047	0,000
M25LS	Lisa	Presente	1,719	0,727	0,129	0,003
M25LS	Lisa	Presente	1,535	1,288	0,136	0,005
M25LS	Lisa	Presente	2,249	1,192	0,159	0,003
M25LS	Lisa	Presente	1,530	1,023	0,149	0,003
M25LS	Lisa	Presente	1,935	1,029	0,040	0,001
M25LS	Lisa	Presente	1,654	0,943	0,047	0,000
M25LS	Lisa	Presente	2,076	0,920	0,037	0,000

Tabela A19 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M30L	Lisa	Ausente	1,892	0,970	0,127	0,007
M30L	Lisa	Ausente	1,520	1,073	0,109	0,006
M30L	Lisa	Ausente	1,275	0,819	0,077	0,000
M30L	Lisa	Ausente	1,849	1,321	0,153	0,000
M30L	Lisa	Ausente	1,817	1,300	0,138	0,001
M30L	Lisa	Ausente	1,356	1,164	0,070	0,004
M30L	Lisa	Ausente	1,702	1,274	0,110	0,003
M30L	Lisa	Ausente	1,679	1,317	0,076	0,000
M30L	Lisa	Ausente	1,587	1,302	0,080	0,000
M30LS	Lisa	Presente	1,776	0,806	0,053	0,000
M30LS	Lisa	Presente	1,287	0,692	0,073	0,000
M30LS	Lisa	Presente	1,699	0,701	0,116	0,000
M30LS	Lisa	Presente	1,194	0,983	0,144	0,000
M30LS	Lisa	Presente	1,519	1,144	0,095	0,002
M30LS	Lisa	Presente	1,139	1,101	0,120	0,003
M30LS	Lisa	Presente	1,211	1,323	0,075	0,005
M30LS	Lisa	Presente	1,289	1,288	0,080	0,002
M30LS	Lisa	Presente	1,448	1,304	0,118	0,004

Tabela A20 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M35L	Lisa	Ausente	1,476	0,856	0,146	0,006
M35L	Lisa	Ausente	1,838	0,994	0,121	0,005
M35L	Lisa	Ausente	1,907	1,085	0,101	0,003
M35L	Lisa	Ausente	1,593	1,488	0,068	0,006
M35L	Lisa	Ausente	1,927	1,176	0,106	0,004
M35L	Lisa	Ausente	1,867	1,485	0,081	0,007
M35L	Lisa	Ausente	1,546	1,403	0,105	0,000
M35L	Lisa	Ausente	1,418	1,282	0,106	0,001
M35L	Lisa	Ausente	1,758	1,342	0,068	0,001
M35LS	Lisa	Presente	1,748	1,241	0,087	0,000
M35LS	Lisa	Presente	1,353	1,122	0,117	0,000
M35LS	Lisa	Presente	1,926	0,950	0,050	0,003
M35LS	Lisa	Presente	1,601	1,094	0,125	0,007
M35LS	Lisa	Presente	1,780	1,423	0,070	0,006
M35LS	Lisa	Presente	1,345	1,382	0,106	0,007
M35LS	Lisa	Presente	1,279	1,420	0,136	0,006
M35LS	Lisa	Presente	1,797	1,338	0,060	0,005
M35LS	Lisa	Presente	1,790	1,378	0,058	0,005

Tabela A21 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P25L	Lisa	Ausente	1,975	1,144	0,112	0,000
P25L	Lisa	Ausente	2,058	0,941	0,117	0,000
P25L	Lisa	Ausente	1,829	0,827	0,081	0,011
P25L	Lisa	Ausente	2,124	1,021	0,105	0,000
P25L	Lisa	Ausente	2,056	1,305	0,083	0,014
P25L	Lisa	Ausente	2,268	1,175	0,149	0,005
P25L	Lisa	Ausente	1,521	1,281	0,140	0,003
P25L	Lisa	Ausente	1,604	1,291	0,060	0,002
P25L	Lisa	Ausente	1,568	1,314	0,105	0,001
P25LS	Lisa	Presente	1,566	0,981	0,164	0,000
P25LS	Lisa	Presente	1,665	0,864	0,115	0,000
P25LS	Lisa	Presente	2,069	0,979	0,044	0,000
P25LS	Lisa	Presente	1,667	1,332	0,051	0,000
P25LS	Lisa	Presente	2,028	1,369	0,117	0,003
P25LS	Lisa	Presente	1,664	1,193	0,078	0,004
P25LS	Lisa	Presente	1,493	1,336	0,149	0,006
P25LS	Lisa	Presente	1,798	1,320	0,085	0,001
P25LS	Lisa	Presente	1,620	1,366	0,107	0,002

Tabela A22 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P30L	Lisa	Ausente	1,971	0,893	0,114	0,000
P30L	Lisa	Ausente	2,065	0,826	0,108	0,003
P30L	Lisa	Ausente	1,534	0,983	0,136	0,006
P30L	Lisa	Ausente	1,845	1,197	0,049	0,000
P30L	Lisa	Ausente	1,330	1,311	0,132	0,001
P30L	Lisa	Ausente	1,769	1,209	0,045	0,004
P30L	Lisa	Ausente	1,348	1,407	0,111	0,000
P30L	Lisa	Ausente	1,308	1,353	0,122	0,000
P30L	Lisa	Ausente	2,012	1,378	0,077	0,000
P30LS	Lisa	Presente	1,798	0,953	0,107	0,007
P30LS	Lisa	Presente	1,243	1,095	0,123	0,005
P30LS	Lisa	Presente	1,325	0,933	0,082	0,006
P30LS	Lisa	Presente	1,919	1,397	0,120	0,003
P30LS	Lisa	Presente	1,713	1,389	0,086	0,003
P30LS	Lisa	Presente	1,369	1,384	0,104	0,002
P30LS	Lisa	Presente	1,529	1,045	0,106	0,000
P30LS	Lisa	Presente	1,405	1,183	0,054	0,000
P30LS	Lisa	Presente	1,449	1,214	0,064	0,000

Tabela A23 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P35L	Lisa	Ausente	1,227	1,069	0,060	0,011
P35L	Lisa	Ausente	1,658	0,831	0,038	0,006
P35L	Lisa	Ausente	1,226	0,952	0,122	0,010
P35L	Lisa	Ausente	1,692	1,283	0,069	0,009
P35L	Lisa	Ausente	1,477	1,224	0,040	0,000
P35L	Lisa	Ausente	1,507	1,150	0,034	0,001
P35L	Lisa	Ausente	1,207	1,417	0,135	0,004
P35L	Lisa	Ausente	1,523	1,365	0,159	0,005
P35L	Lisa	Ausente	1,794	1,388	0,162	0,000
P35LS	Lisa	Presente	1,462	0,965	0,076	0,008
P35LS	Lisa	Presente	1,836	0,818	0,130	0,008
P35LS	Lisa	Presente	1,325	0,880	0,149	0,006
P35LS	Lisa	Presente	1,789	0,973	0,101	0,000
P35LS	Lisa	Presente	1,884	1,238	0,104	0,000
P35LS	Lisa	Presente	1,254	1,140	0,098	0,001
P35LS	Lisa	Presente	1,392	1,240	0,060	0,002
P35LS	Lisa	Presente	1,657	1,385	0,047	0,001
P35LS	Lisa	Presente	1,511	1,405	0,027	0,000

Tabela A24 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo controle. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
CR	Rugosa	Ausente	2,235	1,835	0,144	0,006
CR	Rugosa	Ausente	2,088	1,961	0,123	0,002
CR	Rugosa	Ausente	2,322	1,976	0,141	0,004
CR	Rugosa	Ausente	2,158	1,992	0,062	0,002
CR	Rugosa	Ausente	2,265	2,050	0,067	0,000
CR	Rugosa	Ausente	2,436	1,872	0,070	0,006
CR	Rugosa	Ausente	2,276	1,787	0,153	0,000
CR	Rugosa	Ausente	2,289	1,726	0,132	0,000
CR	Rugosa	Ausente	2,477	1,757	0,119	0,011
CRS	Rugosa	Presente	1,709	1,835	0,040	0,001
CRS	Rugosa	Presente	1,837	1,461	0,121	0,004
CRS	Rugosa	Presente	2,240	1,202	0,082	0,003
CRS	Rugosa	Presente	2,085	1,887	0,066	0,000
CRS	Rugosa	Presente	1,821	1,647	0,098	0,000
CRS	Rugosa	Presente	2,214	1,827	0,133	0,009
CRS	Rugosa	Presente	2,103	1,285	0,091	0,004
CRS	Rugosa	Presente	2,032	1,681	0,151	0,004
CRS	Rugosa	Presente	1,469	1,820	0,092	0,001

Tabela A25 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M25R	Rugosa	Ausente	2,035	1,282	0,147	0,005
M25R	Rugosa	Ausente	2,115	1,305	0,103	0,000
M25R	Rugosa	Ausente	1,633	1,209	0,088	0,010
M25R	Rugosa	Ausente	2,095	1,629	0,124	0,008
M25R	Rugosa	Ausente	2,148	1,572	0,111	0,002
M25R	Rugosa	Ausente	1,608	1,508	0,106	0,000
M25R	Rugosa	Ausente	1,718	1,412	0,140	0,001
M25R	Rugosa	Ausente	1,584	1,295	0,081	0,001
M25R	Rugosa	Ausente	1,262	1,336	0,102	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	2,036	0,914	0,027	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	1,726	0,947	0,129	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	2,053	0,968	0,042	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	1,610	1,437	0,076	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	2,085	1,471	0,142	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	2,047	1,453	0,158	0,002
M25RS	Rugosa	Presente	1,893	1,366	0,137	0,003
M25RS	Rugosa	Presente	1,722	1,220	0,079	0,000
M25RS	Rugosa	Presente	1,978	1,376	0,048	0,000

Tabela A26 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M30R	Rugosa	Ausente	1,960	0,963	0,087	0,008
M30R	Rugosa	Ausente	1,786	1,036	0,101	0,000
M30R	Rugosa	Ausente	1,343	1,045	0,069	0,000
M30R	Rugosa	Ausente	1,736	1,562	0,142	0,008
M30R	Rugosa	Ausente	1,614	1,415	0,044	0,000
M30R	Rugosa	Ausente	1,604	1,154	0,120	0,000
M30R	Rugosa	Ausente	1,495	1,130	0,079	0,001
M30R	Rugosa	Ausente	1,256	1,313	0,131	0,000
M30R	Rugosa	Ausente	1,430	1,176	0,048	0,006
M30RS	Rugosa	Presente	1,421	0,935	0,033	0,010
M30RS	Rugosa	Presente	1,930	0,978	0,050	0,012
M30RS	Rugosa	Presente	1,760	1,084	0,070	0,010
M30RS	Rugosa	Presente	1,538	1,109	0,107	0,001
M30RS	Rugosa	Presente	1,565	1,476	0,134	0,000
M30RS	Rugosa	Presente	1,622	1,551	0,137	0,000
M30RS	Rugosa	Presente	1,297	1,216	0,128	0,001
M30RS	Rugosa	Presente	1,611	1,146	0,097	0,002
M30RS	Rugosa	Presente	1,589	1,265	0,081	0,000

Tabela A27 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
M35R	Rugosa	Ausente	1,616	0,960	0,062	0,010
M35R	Rugosa	Ausente	2,164	1,016	0,124	0,010
M35R	Rugosa	Ausente	1,964	0,804	0,060	0,007
M35R	Rugosa	Ausente	1,953	1,293	0,113	0,007
M35R	Rugosa	Ausente	2,118	1,324	0,134	0,004
M35R	Rugosa	Ausente	1,442	1,369	0,077	0,003
M35R	Rugosa	Ausente	1,980	1,286	0,108	0,007
M35R	Rugosa	Ausente	1,751	1,250	0,088	0,007
M35R	Rugosa	Ausente	1,615	1,278	0,138	0,000
M35RS	Rugosa	Presente	1,421	0,911	0,019	0,007
M35RS	Rugosa	Presente	1,506	1,094	0,076	0,011
M35RS	Rugosa	Presente	1,956	1,028	0,057	0,005
M35RS	Rugosa	Presente	1,503	1,417	0,100	0,001
M35RS	Rugosa	Presente	1,402	1,427	0,116	0,000
M35RS	Rugosa	Presente	1,482	1,482	0,140	0,000
M35RS	Rugosa	Presente	1,558	1,307	0,156	0,001
M35RS	Rugosa	Presente	1,543	1,255	0,057	0,005
M35RS	Rugosa	Presente	1,542	1,281	0,052	0,000

Tabela A28 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P25. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P25R	Rugosa	Ausente	2,219	0,739	0,141	0,010
P25R	Rugosa	Ausente	2,384	0,892	0,143	0,006
P25R	Rugosa	Ausente	2,438	0,961	0,041	0,006
P25R	Rugosa	Ausente	2,322	1,162	0,085	0,000
P25R	Rugosa	Ausente	2,242	1,180	0,091	0,000
P25R	Rugosa	Ausente	2,470	1,365	0,074	0,003
P25R	Rugosa	Ausente	2,371	1,236	0,130	0,004
P25R	Rugosa	Ausente	1,957	1,339	0,129	0,000
P25R	Rugosa	Ausente	1,625	1,312	0,134	0,003
P25RS	Rugosa	Presente	1,358	1,319	0,029	0,007
P25RS	Rugosa	Presente	1,945	1,325	0,021	0,006
P25RS	Rugosa	Presente	1,955	1,206	0,072	0,007
P25RS	Rugosa	Presente	1,225	1,163	0,114	0,012
P25RS	Rugosa	Presente	1,727	1,355	0,142	0,006
P25RS	Rugosa	Presente	1,468	1,073	0,150	0,006
P25RS	Rugosa	Presente	1,802	0,815	0,119	0,001
P25RS	Rugosa	Presente	2,060	0,938	0,051	0,000
P25RS	Rugosa	Presente	2,056	0,763	0,047	0,000

Tabela A29 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P30. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P30R	Rugosa	Ausente	1,828	1,490	0,057	0,010
P30R	Rugosa	Ausente	2,111	1,188	0,061	0,008
P30R	Rugosa	Ausente	2,163	1,188	0,061	0,006
P30R	Rugosa	Ausente	2,365	1,585	0,130	0,000
P30R	Rugosa	Ausente	2,031	1,570	0,144	0,000
P30R	Rugosa	Ausente	2,179	1,547	0,144	0,002
P30R	Rugosa	Ausente	1,558	1,356	0,081	0,000
P30R	Rugosa	Ausente	2,105	1,237	0,146	0,003
P30R	Rugosa	Ausente	1,907	1,296	0,089	0,000
P30RS	Rugosa	Presente	1,787	1,306	0,108	0,010
P30RS	Rugosa	Presente	2,261	1,367	0,043	0,007
P30RS	Rugosa	Presente	1,913	1,343	0,014	0,009
P30RS	Rugosa	Presente	2,129	1,282	0,068	0,000
P30RS	Rugosa	Presente	2,034	1,474	0,138	0,000
P30RS	Rugosa	Presente	1,521	1,526	0,129	0,000
P30RS	Rugosa	Presente	1,485	1,371	0,109	0,000
P30RS	Rugosa	Presente	1,973	1,306	0,106	0,002
P30RS	Rugosa	Presente	1,735	1,331	0,090	0,003

Tabela A30 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P35. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Biofilme	Adesão	Escovação	Recolonização
P35R	Rugosa	Ausente	2,112	1,344	0,116	0,009
P35R	Rugosa	Ausente	2,017	1,023	0,057	0,011
P35R	Rugosa	Ausente	2,333	1,235	0,147	0,010
P35R	Rugosa	Ausente	1,919	1,382	0,101	0,000
P35R	Rugosa	Ausente	2,493	1,379	0,151	0,004
P35R	Rugosa	Ausente	2,473	1,173	0,056	0,000
P35R	Rugosa	Ausente	1,978	1,314	0,095	0,000
P35R	Rugosa	Ausente	1,873	1,406	0,127	0,003
P35R	Rugosa	Ausente	2,209	1,357	0,126	0,007
P35RS	Rugosa	Presente	1,624	1,282	0,113	0,006
P35RS	Rugosa	Presente	1,465	1,070	0,111	0,007
P35RS	Rugosa	Presente	1,774	1,328	0,092	0,001
P35RS	Rugosa	Presente	1,500	1,273	0,087	0,005
P35RS	Rugosa	Presente	2,025	1,127	0,132	0,001
P35RS	Rugosa	Presente	2,238	1,450	0,078	0,000
P35RS	Rugosa	Presente	2,059	1,121	0,074	0,000
P35RS	Rugosa	Presente	1,463	1,146	0,118	0,012
P35RS	Rugosa	Presente	1,853	1,137	0,072	0,000

Tabela A31 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova lisos dos grupos controle positivos, para os testes de escovação e recolonização. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Escovação	Recolonização
CL+	Lisa	Ausente	1,13	2,640
CL+	Lisa	Ausente	1,58	2,572
CL+	Lisa	Ausente	1,24	2,601
CL+	Lisa	Ausente	1,36	2,148
CL+	Lisa	Ausente	1,69	2,411
CL+	Lisa	Ausente	1,79	2,333
CL+	Lisa	Ausente	1,50	2,197
CL+	Lisa	Ausente	1,44	2,093
CL+	Lisa	Ausente	1,51	2,095
CLS+	Lisa	Presente	1,36	2,503
CLS+	Lisa	Presente	1,13	2,641
CLS+	Lisa	Presente	1,05	2,510
CLS+	Lisa	Presente	1,75	2,119
CLS+	Lisa	Presente	1,18	2,263
CLS+	Lisa	Presente	1,73	2,288
CLS+	Lisa	Presente	1,39	2,249
CLS+	Lisa	Presente	1,35	2,081
CLS+	Lisa	Presente	1,34	2,306

Tabela A32 – Médias de atividade metabólica (absorbância) referentes aos corpos-de-prova rugosos dos grupos controle positivos, para os testes de escovação e recolonização. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	Escovação	Recolonização
CL+	Lisa	Ausente	2,17	2,687
CL+	Lisa	Ausente	1,57	2,502
CL+	Lisa	Ausente	1,18	2,488
CL+	Lisa	Ausente	1,53	2,252
CL+	Lisa	Ausente	1,81	2,286
CL+	Lisa	Ausente	1,20	2,252
CL+	Lisa	Ausente	1,60	2,160
CL+	Lisa	Ausente	1,55	2,265
CL+	Lisa	Ausente	1,57	2,078
CLS+	Lisa	Presente	1,47	2,470
CLS+	Lisa	Presente	1,67	2,511
CLS+	Lisa	Presente	1,88	2,564
CLS+	Lisa	Presente	1,53	2,269
CLS+	Lisa	Presente	1,37	2,495
CLS+	Lisa	Presente	1,49	2,163
CLS+	Lisa	Presente	1,62	2,180
CLS+	Lisa	Presente	1,51	2,028
CLS+	Lisa	Presente	1,56	2,144

Tabela A33 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo controle, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			<i>ufc/mL</i>	<i>log ufc/mL</i>		<i>ufc/mL</i>	<i>log ufc/mL</i>	
CL	Lisa	Ausente	5,653	5,176	7,114	5,653	5,176	7,114
CL	Lisa	Ausente	5,544	5,000	6,875	5,544	5,000	6,875
CL	Lisa	Ausente	5,477	5,544	6,061	5,477	5,544	6,061
CL	Lisa	Ausente	5,477	6,267	6,875	5,477	6,267	6,875
CL	Lisa	Ausente	5,477	5,929	6,699	5,477	5,929	6,699
CL	Lisa	Ausente	5,740	6,146	6,978	5,740	6,146	6,978
CL	Lisa	Ausente	6,477	6,301	5,813	6,477	6,301	5,813
CL	Lisa	Ausente	4,699	5,301	6,929	4,699	5,301	6,929
CL	Lisa	Ausente	5,398	5,477	6,000	5,398	5,477	6,000
CLS	Lisa	Presente	4,602	5,653	6,954	4,602	5,653	6,954
CLS	Lisa	Presente	5,602	5,740	5,929	5,602	5,740	5,929
CLS	Lisa	Presente	5,740	5,301	5,903	5,740	5,301	5,903
CLS	Lisa	Presente	5,477	6,279	6,477	5,477	6,279	6,477
CLS	Lisa	Presente	4,813	6,161	6,778	4,813	6,161	6,778
CLS	Lisa	Presente	5,398	5,813	7,477	5,398	5,813	7,477
CLS	Lisa	Presente	4,699	5,653	6,061	4,699	5,653	6,061
CLS	Lisa	Presente	5,398	5,176	5,929	5,398	5,176	5,929
CLS	Lisa	Presente	5,602	5,602	6,653	5,602	5,602	6,653

Tabela A34 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M25, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			<i>ufc/mL</i>	<i>log ufc/mL</i>		<i>ufc/mL</i>	<i>log ufc/mL</i>	
M25L	Lisa	Ausente	5,477	4,699	5,398	5,477	4,699	5,398
M25L	Lisa	Ausente	5,000	5,653	5,477	5,000	5,653	5,477
M25L	Lisa	Ausente	5,000	5,602	5,000	5,000	5,602	5,000
M25L	Lisa	Ausente	5,602	6,279	6,813	5,602	6,279	6,813
M25L	Lisa	Ausente	5,477	5,929	5,954	5,477	5,929	5,954
M25L	Lisa	Ausente	5,301	5,653	6,230	5,301	5,653	6,230
M25L	Lisa	Ausente	5,653	5,398	5,176	5,653	5,398	5,176
M25L	Lisa	Ausente	4,398	5,477	5,477	4,398	5,477	5,477
M25L	Lisa	Ausente	5,544	5,398	5,544	5,544	5,398	5,544
M25LS	Lisa	Presente	5,477	5,000	6,301	5,477	5,000	6,301
M25LS	Lisa	Presente	5,477	5,176	5,301	5,477	5,176	5,301
M25LS	Lisa	Presente	5,477	4,699	5,176	5,477	4,699	5,176
M25LS	Lisa	Presente	4,699	5,813	5,301	4,699	5,813	5,301
M25LS	Lisa	Presente	5,000	5,978	7,061	5,000	5,978	7,061
M25LS	Lisa	Presente	5,544	5,653	5,875	5,544	5,653	5,875
M25LS	Lisa	Presente	5,398	5,778	6,301	5,398	5,778	6,301
M25LS	Lisa	Presente	5,398	4,699	5,875	5,398	4,699	5,875
M25LS	Lisa	Presente	4,176	5,875	5,875	4,176	5,875	5,875

Tabela A35 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M30, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			ufc/mL			log ufc/mL		
M30L	Lisa	Ausente	4,653	5,845	5,176	4,653	5,845	5,176
M30L	Lisa	Ausente	5,544	6,477	5,176	5,544	6,477	5,176
M30L	Lisa	Ausente	4,398	4,176	5,000	4,398	4,176	5,000
M30L	Lisa	Ausente	5,301	5,929	6,929	5,301	5,929	6,929
M30L	Lisa	Ausente	4,176	5,929	6,398	4,176	5,929	6,398
M30L	Lisa	Ausente	5,301	5,146	7,398	5,301	5,146	7,398
M30L	Lisa	Ausente	4,602	5,477	5,699	4,602	5,477	5,699
M30L	Lisa	Ausente	4,544	5,423	4,699	4,544	5,423	4,699
M30L	Lisa	Ausente	5,398	5,398	5,176	5,398	5,398	5,176
M30LS	Lisa	Presente	5,778	5,398	5,301	5,778	5,398	5,301
M30LS	Lisa	Presente	5,301	5,000	5,000	5,301	5,000	5,000
M30LS	Lisa	Presente	5,398	5,000	4,699	5,398	5,000	4,699
M30LS	Lisa	Presente	4,699	5,477	6,097	4,699	5,477	6,097
M30LS	Lisa	Presente	5,398	5,813	6,061	5,398	5,813	6,061
M30LS	Lisa	Presente	4,176	5,875	6,079	4,176	5,875	6,079
M30LS	Lisa	Presente	5,544	5,813	5,602	5,544	5,813	5,602
M30LS	Lisa	Presente	5,301	5,699	5,653	5,301	5,699	5,653
M30LS	Lisa	Presente	4,653	5,176	5,602	4,653	5,176	5,602

Tabela A36 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo M35, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			ufc/mL			log ufc/mL		
M35L	Lisa	Ausente	5,477	4,699	5,176	4,875	4,699	5,176
M35L	Lisa	Ausente	4,699	5,398	5,477	5,653	5,398	5,477
M35L	Lisa	Ausente	5,778	5,000	5,602	5,954	5,000	5,602
M35L	Lisa	Ausente	5,398	5,544	6,176	5,301	5,544	6,176
M35L	Lisa	Ausente	5,602	5,477	6,415	5,699	5,477	6,415
M35L	Lisa	Ausente	5,602	5,813	6,130	4,000	5,813	6,130
M35L	Lisa	Ausente	5,000	5,740	5,301	4,929	5,740	5,301
M35L	Lisa	Ausente	5,398	5,301	5,740	4,602	5,301	5,740
M35L	Lisa	Ausente	5,301	5,176	6,544	5,544	5,176	6,544
M35LS	Lisa	Presente	5,000	5,176	5,477	5,398	5,176	5,477
M35LS	Lisa	Presente	5,301	5,653	5,176	5,176	5,653	5,176
M35LS	Lisa	Presente	5,000	5,653	5,602	5,176	5,653	5,602
M35LS	Lisa	Presente	5,778	4,699	6,301	5,301	4,699	6,301
M35LS	Lisa	Presente	5,477	5,301	5,954	4,000	5,301	5,954
M35LS	Lisa	Presente	5,000	4,699	6,061	4,699	4,699	6,061
M35LS	Lisa	Presente	5,176	5,778	5,301	5,602	5,778	5,301
M35LS	Lisa	Presente	5,398	5,398	5,602	5,544	5,398	5,602
M35LS	Lisa	Presente	5,000	5,699	6,653	5,544	5,699	6,653

Tabela A37 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P25, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>ufc/mL</i>			<i>log ufc/mL</i>		
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
P25L	Lisa	Ausente	5,477	5,602	5,653	5,477	5,602	5,653
P25L	Lisa	Ausente	4,699	5,000	5,176	4,699	5,000	5,176
P25L	Lisa	Ausente	5,778	4,699	5,740	5,778	4,699	5,740
P25L	Lisa	Ausente	5,398	6,190	6,398	5,398	6,190	6,398
P25L	Lisa	Ausente	5,602	5,301	5,903	5,602	5,301	5,903
P25L	Lisa	Ausente	5,602	5,813	5,301	5,602	5,813	5,301
P25L	Lisa	Ausente	5,000	5,398	5,602	5,000	5,398	5,602
P25L	Lisa	Ausente	5,398	5,875	5,000	5,398	5,875	5,000
P25L	Lisa	Ausente	5,301	5,954	5,740	5,301	5,954	5,740
P25LS	Lisa	Presente	5,000	5,845	5,699	5,000	5,845	5,699
P25LS	Lisa	Presente	5,301	5,398	5,740	5,301	5,398	5,740
P25LS	Lisa	Presente	5,000	5,778	5,699	5,000	5,778	5,699
P25LS	Lisa	Presente	5,778	5,000	5,544	5,778	5,000	5,544
P25LS	Lisa	Presente	5,477	5,653	5,176	5,477	5,653	5,176
P25LS	Lisa	Presente	5,000	5,544	5,398	5,000	5,544	5,398
P25LS	Lisa	Presente	5,176	4,699	5,398	5,176	4,699	5,398
P25LS	Lisa	Presente	5,398	5,000	5,000	5,398	5,000	5,000
P25LS	Lisa	Presente	5,000	5,477	5,176	5,000	5,477	5,176

Tabela A38 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P30, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>ufc/mL</i>			<i>log ufc/mL</i>		
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
P30L	Lisa	Ausente	5,778	4,000	5,875	5,778	4,000	5,875
P30L	Lisa	Ausente	5,176	5,398	5,845	5,176	5,398	5,845
P30L	Lisa	Ausente	4,176	5,398	5,813	4,176	5,398	5,813
P30L	Lisa	Ausente	5,544	5,301	6,021	5,544	5,301	6,021
P30L	Lisa	Ausente	4,301	5,602	5,398	4,301	5,602	5,398
P30L	Lisa	Ausente	5,176	5,740	5,740	5,176	5,740	5,740
P30L	Lisa	Ausente	4,301	5,602	5,740	4,301	5,602	5,740
P30L	Lisa	Ausente	5,477	5,813	5,176	5,477	5,813	5,176
P30L	Lisa	Ausente	5,845	5,740	5,544	5,845	5,740	5,544
P30LS	Lisa	Presente	4,398	5,000	5,000	4,398	5,000	5,000
P30LS	Lisa	Presente	5,544	5,000	4,699	5,544	5,000	4,699
P30LS	Lisa	Presente	5,176	4,699	5,176	5,176	4,699	5,176
P30LS	Lisa	Presente	4,699	6,079	6,255	4,699	6,079	6,255
P30LS	Lisa	Presente	5,000	5,000	5,176	5,000	5,000	5,176
P30LS	Lisa	Presente	4,000	5,000	5,301	4,000	5,000	5,301
P30LS	Lisa	Presente	5,176	5,301	5,176	5,176	5,301	5,176
P30LS	Lisa	Presente	5,301	5,000	4,699	5,301	5,000	4,699
P30LS	Lisa	Presente	5,176	5,176	5,000	5,176	5,176	5,000

Tabela A39 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos do grupo P35, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			ufc/mL			log ufc/mL		
P35L	Lisa	Ausente	4,477	5,176	5,544	4,477	5,176	5,544
P35L	Lisa	Ausente	5,477	5,477	5,398	5,477	5,477	5,398
P35L	Lisa	Ausente	5,301	5,176	5,000	5,301	5,176	5,000
P35L	Lisa	Ausente	5,477	4,699	6,322	5,477	4,699	6,322
P35L	Lisa	Ausente	4,398	5,875	6,000	4,398	5,875	6,000
P35L	Lisa	Ausente	4,398	5,903	6,352	4,398	5,903	6,352
P35L	Lisa	Ausente	5,301	4,699	5,398	5,301	4,699	5,398
P35L	Lisa	Ausente	3,699	5,398	5,176	3,699	5,398	5,176
P35L	Lisa	Ausente	4,477	5,477	5,699	4,477	5,477	5,699
P35LS	Lisa	Presente	5,903	5,699	5,301	5,903	5,699	5,301
P35LS	Lisa	Presente	5,653	5,000	5,477	5,653	5,000	5,477
P35LS	Lisa	Presente	5,653	5,398	5,000	5,653	5,398	5,000
P35LS	Lisa	Presente	4,699	5,176	4,699	4,699	5,176	4,699
P35LS	Lisa	Presente	5,176	5,544	4,699	5,176	5,544	4,699
P35LS	Lisa	Presente	4,699	5,301	4,699	4,699	5,301	4,699
P35LS	Lisa	Presente	5,301	6,230	6,602	5,301	6,230	6,602
P35LS	Lisa	Presente	5,176	6,114	6,176	5,176	6,114	6,176
P35LS	Lisa	Presente	5,477	5,544	6,699	5,477	5,544	6,699

Tabela A40 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo controle. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			ufc/mL			log ufc/mL		
CR	Rugosa	Ausente	5,845	5,653	6,778	5,845	5,653	6,778
CR	Rugosa	Ausente	6,477	5,000	6,398	6,477	5,000	6,398
CR	Rugosa	Ausente	4,699	5,000	5,699	4,699	5,000	5,699
CR	Rugosa	Ausente	5,477	6,389	7,380	5,477	6,389	7,380
CR	Rugosa	Ausente	5,301	6,954	7,455	5,301	6,954	7,455
CR	Rugosa	Ausente	5,954	6,477	7,477	5,954	6,477	7,477
CR	Rugosa	Ausente	5,000	5,477	6,398	5,000	5,477	6,398
CR	Rugosa	Ausente	5,954	5,477	6,301	5,954	5,477	6,301
CR	Rugosa	Ausente	5,813	5,301	6,398	5,813	5,301	6,398
CRS	Rugosa	Presente	5,602	5,845	6,398	5,602	5,845	6,398
CRS	Rugosa	Presente	5,544	5,740	6,813	5,544	5,740	6,813
CRS	Rugosa	Presente	5,699	6,243	6,000	5,699	6,243	6,000
CRS	Rugosa	Presente	5,301	5,602	6,000	5,301	5,602	6,000
CRS	Rugosa	Presente	5,398	5,544	6,978	5,398	5,544	6,978
CRS	Rugosa	Presente	5,301	5,176	7,267	5,301	5,176	7,267
CRS	Rugosa	Presente	5,000	5,699	6,544	5,000	5,699	6,544
CRS	Rugosa	Presente	4,699	5,176	6,653	4,699	5,176	6,653
CRS	Rugosa	Presente	5,602	4,699	6,845	5,602	4,699	6,845

Tabela A41 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M25, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			ufc/mL			log ufc/mL		
M25R	Rugosa	Ausente	4,699	5,740	5,176	4,699	5,740	5,176
M25R	Rugosa	Ausente	5,903	5,653	4,699	5,903	5,653	4,699
M25R	Rugosa	Ausente	5,477	5,398	5,000	5,477	5,398	5,000
M25R	Rugosa	Ausente	5,301	5,778	7,389	5,301	5,778	7,389
M25R	Rugosa	Ausente	5,000	5,699	7,217	5,000	5,699	7,217
M25R	Rugosa	Ausente	5,398	5,813	6,398	5,398	5,813	6,398
M25R	Rugosa	Ausente	5,477	5,477	4,699	5,477	5,477	4,699
M25R	Rugosa	Ausente	5,653	5,845	4,699	5,653	5,845	4,699
M25R	Rugosa	Ausente	5,477	5,000	5,477	5,477	5,000	5,477
M25RS	Rugosa	Presente	5,602	4,699	5,544	5,602	4,699	5,544
M25RS	Rugosa	Presente	5,000	4,699	5,544	5,000	4,699	5,544
M25RS	Rugosa	Presente	4,699	4,699	5,301	4,699	4,699	5,301
M25RS	Rugosa	Presente	5,398	5,813	4,699	5,398	5,813	4,699
M25RS	Rugosa	Presente	5,301	6,021	5,699	5,301	6,021	5,699
M25RS	Rugosa	Presente	5,000	6,301	6,243	5,000	6,301	6,243
M25RS	Rugosa	Presente	5,477	4,699	5,813	5,477	4,699	5,813
M25RS	Rugosa	Presente	4,699	5,176	5,398	4,699	5,176	5,398
M25RS	Rugosa	Presente	5,602	5,301	5,544	5,602	5,301	5,544

Tabela A42 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M30, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. mutans</i>		
			ufc/mL			log ufc/mL		
M30R	Rugosa	Ausente	5,398	6,061	6,699	5,398	6,061	6,699
M30R	Rugosa	Ausente	5,301	5,544	6,699	5,301	5,544	6,699
M30R	Rugosa	Ausente	5,301	4,699	7,176	5,301	4,699	7,176
M30R	Rugosa	Ausente	5,477	6,097	5,903	5,477	6,097	5,903
M30R	Rugosa	Ausente	5,602	6,332	5,845	5,602	6,332	5,845
M30R	Rugosa	Ausente	5,740	6,470	5,544	5,740	6,470	5,544
M30R	Rugosa	Ausente	4,699	4,699	5,740	4,699	4,699	5,740
M30R	Rugosa	Ausente	4,699	4,699	5,653	4,699	4,699	5,653
M30R	Rugosa	Ausente	5,301	5,301	4,699	5,301	5,301	4,699
M30RS	Rugosa	Presente	5,301	5,813	6,161	5,301	5,813	6,161
M30RS	Rugosa	Presente	4,176	5,000	5,653	4,176	5,000	5,653
M30RS	Rugosa	Presente	5,544	4,699	5,398	5,544	4,699	5,398
M30RS	Rugosa	Presente	5,000	5,778	6,332	5,000	5,778	6,332
M30RS	Rugosa	Presente	3,699	6,740	6,176	3,699	6,740	6,176
M30RS	Rugosa	Presente	4,699	5,813	6,322	4,699	5,813	6,322
M30RS	Rugosa	Presente	5,176	5,000	5,398	5,176	5,000	5,398
M30RS	Rugosa	Presente	5,000	5,398	4,699	5,000	5,398	4,699
M30RS	Rugosa	Presente	5,301	5,653	5,875	5,301	5,653	5,875

Tabela A43 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo M35, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i>			<i>S. mutans</i>		
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
			ufc/mL			log ufc/mL		
M35R	Rugosa	Ausente	6,079	5,398	5,301	6,079	5,398	5,301
M35R	Rugosa	Ausente	5,301	5,176	4,699	5,301	5,176	4,699
M35R	Rugosa	Ausente	4,699	5,301	4,699	4,699	5,301	4,699
M35R	Rugosa	Ausente	5,000	5,544	7,000	5,000	5,544	7,000
M35R	Rugosa	Ausente	5,778	5,903	6,301	5,778	5,903	6,301
M35R	Rugosa	Ausente	5,176	5,301	6,602	5,176	5,301	6,602
M35R	Rugosa	Ausente	5,813	5,301	5,176	5,813	5,301	5,176
M35R	Rugosa	Ausente	4,176	4,699	5,699	4,176	4,699	5,699
M35R	Rugosa	Ausente	5,699	5,398	5,653	5,699	5,398	5,653
M35RS	Rugosa	Presente	5,602	5,176	5,301	5,602	5,176	5,301
M35RS	Rugosa	Presente	5,301	4,699	5,398	5,301	4,699	5,398
M35RS	Rugosa	Presente	4,301	5,000	5,929	4,301	5,000	5,929
M35RS	Rugosa	Presente	5,845	6,439	5,301	5,845	6,439	5,301
M35RS	Rugosa	Presente	4,699	5,778	5,398	4,699	5,778	5,398
M35RS	Rugosa	Presente	4,176	5,845	5,301	4,176	5,845	5,301
M35RS	Rugosa	Presente	5,544	5,602	6,204	5,544	5,602	6,204
M35RS	Rugosa	Presente	5,301	5,875	6,190	5,301	5,875	6,190
M35RS	Rugosa	Presente	5,398	5,176	5,699	5,398	5,176	5,699

Tabela A44 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P25, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i>			<i>S. mutans</i>		
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
			ufc/mL			log ufc/mL		
P25R	Rugosa	Ausente	5,653	5,477	5,778	5,653	5,477	5,778
P25R	Rugosa	Ausente	5,544	5,653	5,875	5,544	5,653	5,875
P25R	Rugosa	Ausente	5,544	5,740	4,699	5,544	5,740	4,699
P25R	Rugosa	Ausente	4,699	5,978	6,875	4,699	5,978	6,875
P25R	Rugosa	Ausente	5,477	5,875	6,653	5,477	5,875	6,653
P25R	Rugosa	Ausente	5,544	5,699	6,778	5,544	5,699	6,778
P25R	Rugosa	Ausente	5,845	5,176	5,903	5,845	5,176	5,903
P25R	Rugosa	Ausente	5,477	5,653	5,653	5,477	5,653	5,653
P25R	Rugosa	Ausente	5,778	5,176	5,398	5,778	5,176	5,398
P25RS	Rugosa	Presente	5,544	5,176	5,398	5,544	5,176	5,398
P25RS	Rugosa	Presente	5,176	5,176	5,398	5,176	5,176	5,398
P25RS	Rugosa	Presente	5,000	4,699	5,398	5,000	4,699	5,398
P25RS	Rugosa	Presente	5,778	5,929	5,740	5,778	5,929	5,740
P25RS	Rugosa	Presente	5,477	5,778	6,000	5,477	5,778	6,000
P25RS	Rugosa	Presente	5,000	5,778	6,146	5,000	5,778	6,146
P25RS	Rugosa	Presente	5,602	5,398	5,903	5,602	5,398	5,903
P25RS	Rugosa	Presente	5,000	5,602	5,176	5,000	5,602	5,176
P25RS	Rugosa	Presente	5,176	5,699	5,301	5,176	5,699	5,301

Tabela A45 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P30, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
			ufc/mL			log ufc/mL		
P30R	Rugosa	Ausente	5,477	6,204	5,740	5,477	6,204	5,740
P30R	Rugosa	Ausente	5,301	5,845	5,602	5,301	5,845	5,602
P30R	Rugosa	Ausente	5,301	5,398	5,477	5,301	5,398	5,477
P30R	Rugosa	Ausente	4,699	6,079	5,954	4,699	6,079	5,954
P30R	Rugosa	Ausente	5,301	6,431	6,176	5,301	6,431	6,176
P30R	Rugosa	Ausente	5,301	6,217	5,875	5,301	6,217	5,875
P30R	Rugosa	Ausente	5,544	5,301	5,929	5,544	5,301	5,929
P30R	Rugosa	Ausente	5,477	4,699	5,398	5,477	4,699	5,398
P30R	Rugosa	Ausente	5,954	5,176	5,544	5,954	5,176	5,544
P30RS	Rugosa	Presente	5,477	5,845	5,602	5,477	5,845	5,602
P30RS	Rugosa	Presente	5,176	5,740	5,699	5,176	5,740	5,699
P30RS	Rugosa	Presente	5,398	5,176	5,929	5,398	5,176	5,929
P30RS	Rugosa	Presente	4,699	5,978	5,929	4,699	5,978	5,929
P30RS	Rugosa	Presente	5,301	6,021	6,407	5,301	6,021	6,407
P30RS	Rugosa	Presente	5,176	5,602	5,778	5,176	5,602	5,778
P30RS	Rugosa	Presente	5,778	5,699	5,740	5,778	5,699	5,740
P30RS	Rugosa	Presente	5,477	5,000	5,000	5,477	5,000	5,000
P30RS	Rugosa	Presente	5,954	5,176	5,000	5,954	5,176	5,000

Tabela A46 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova rugosos do grupo P35, para os testes de adesão e formação do biofilme. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
			ufc/mL			log ufc/mL		
P35R	Rugosa	Ausente	5,301	5,176	5,978	5,301	5,176	5,978
P35R	Rugosa	Ausente	4,699	5,778	5,653	4,699	5,778	5,653
P35R	Rugosa	Ausente	5,778	5,176	6,021	5,778	5,176	6,021
P35R	Rugosa	Ausente	5,477	6,161	5,903	5,477	6,161	5,903
P35R	Rugosa	Ausente	5,000	6,322	6,000	5,000	6,322	6,000
P35R	Rugosa	Ausente	5,301	6,362	5,813	5,301	6,362	5,813
P35R	Rugosa	Ausente	5,176	5,544	5,301	5,176	5,544	5,301
P35R	Rugosa	Ausente	5,544	5,398	5,778	5,544	5,398	5,778
P35R	Rugosa	Ausente	5,477	5,699	5,602	5,477	5,699	5,602
P35RS	Rugosa	Presente	5,602	4,699	5,000	5,602	4,699	5,000
P35RS	Rugosa	Presente	5,301	5,740	4,699	5,301	5,740	4,699
P35RS	Rugosa	Presente	5,176	5,477	5,000	5,176	5,477	5,000
P35RS	Rugosa	Presente	5,477	5,176	6,061	5,477	5,176	6,061
P35RS	Rugosa	Presente	5,602	5,903	5,954	5,602	5,903	5,954
P35RS	Rugosa	Presente	5,000	6,061	6,021	5,000	6,061	6,021
P35RS	Rugosa	Presente	5,301	5,398	5,740	5,301	5,398	5,740
P35RS	Rugosa	Presente	5,477	5,740	5,740	5,477	5,740	5,740
P35RS	Rugosa	Presente	4,699	5,301	6,097	4,699	5,301	6,097

Tabela A47 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos dos grupos controle positivos, para os testes de escovação e recolonização. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
			ufc/mL			log ufc/mL		
CL+	Lisa	Ausente	5,653	5,176	7,114	7,33	7,68	7,97
CL+	Lisa	Ausente	5,544	5,000	6,875	7,02	7,06	7,68
CL+	Lisa	Ausente	5,477	5,544	6,061	7,26	7,65	7,82
CL+	Lisa	Ausente	5,477	6,267	6,875	5,74	6,33	7,49
CL+	Lisa	Ausente	5,477	5,929	6,699	6,00	6,32	7,50
CL+	Lisa	Ausente	5,740	6,146	6,978	6,06	6,46	7,62
CL+	Lisa	Ausente	6,477	6,301	5,813	5,65	6,26	7,43
CL+	Lisa	Ausente	4,699	5,301	6,929	5,54	6,02	7,22
CL+	Lisa	Ausente	5,398	5,477	6,000	6,10	6,48	7,65
CLS+	Lisa	Presente	4,602	5,653	6,954	6,13	6,27	6,28
CLS+	Lisa	Presente	5,602	5,740	5,929	6,48	6,92	7,60
CLS+	Lisa	Presente	5,740	5,301	5,903	6,30	6,35	7,47
CLS+	Lisa	Presente	5,477	6,279	6,477	6,30	6,30	7,18
CLS+	Lisa	Presente	4,813	6,161	6,778	5,70	6,10	6,16
CLS+	Lisa	Presente	5,398	5,813	7,477	6,16	6,13	6,26
CLS+	Lisa	Presente	4,699	5,653	6,061	6,26	6,30	6,43
CLS+	Lisa	Presente	5,398	5,176	5,929	6,20	6,30	6,33
CLS+	Lisa	Presente	5,602	5,602	6,653	5,54	6,08	6,81

Tabela A48 – Médias de ufc/mL e log ufc/mL dos micro-organismos referentes aos corpos-de-prova lisos dos grupos controle positivos, para os testes de escovação e recolonização. Araraquara 2013.

Grupo	Superfície	Saliva	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. mutans</i>
			ufc/mL			log ufc/mL		
CR+	Lisa	Ausente	5,845	5,653	6,778	7,06	7,48	7,88
CR+	Lisa	Ausente	6,477	5,000	6,398	7,04	7,04	7,73
CR+	Lisa	Ausente	4,699	5,000	5,699	6,60	7,00	7,72
CR+	Lisa	Ausente	5,477	6,389	7,380	6,11	6,60	6,06
CR+	Lisa	Ausente	5,301	6,954	7,455	6,19	6,80	6,98
CR+	Lisa	Ausente	5,954	6,477	7,477	5,98	6,59	6,02
CR+	Lisa	Ausente	5,000	5,477	6,398	5,78	6,28	6,88
CR+	Lisa	Ausente	5,954	5,477	6,301	6,13	6,64	6,23
CR+	Lisa	Ausente	5,813	5,301	6,398	5,88	6,45	6,95
CRS+	Lisa	Presente	5,602	5,845	6,398	6,30	6,54	7,40
CRS+	Lisa	Presente	5,544	5,740	6,813	6,81	6,70	7,56
CRS+	Lisa	Presente	5,699	6,243	6,000	6,90	7,00	7,82
CRS+	Lisa	Presente	5,301	5,602	6,000	5,98	6,64	6,70
CRS+	Lisa	Presente	5,398	5,544	6,978	5,18	6,13	6,30
CRS+	Lisa	Presente	5,301	5,176	7,267	5,48	6,19	6,60
CRS+	Lisa	Presente	5,000	5,699	6,544	5,74	6,54	6,70
CRS+	Lisa	Presente	4,699	5,176	6,653	5,54	6,44	6,65
CRS+	Lisa	Presente	5,602	4,699	6,845	5,00	6,18	6,18

Tabela A49 - Sumário da análise de variância para avaliação de absorvâncias do método XTT, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,0139	0,37	0,542
Concentração (2)	2	0,0504	1,35	0,260
Superfície (3)	1	0,4343	11,65	0,001 *
Saliva (4)	1	0,1168	3,13	0,078
(1) x (2)	2	0,1604	4,30	0,015
(1) x (3)	1	0,0038	0,10	0,749
(2) x (3)	2	0,0601	1,61	0,202
(1) x (4)	1	0,0268	0,72	0,398
(2) x (4)	2	0,0239	0,64	0,527
(3) x (4)	1	0,0035	0,09	0,760
(1) x (2) x (3)	2	0,2666	7,16	0,001 *
(1) x (2) x (4)	2	0,1111	2,98	0,053
(1) x (3) x (4)	1	0,0390	1,05	0,307
(2) x (3) x (4)	2	0,0049	0,13	0,876
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,0032	0,09	0,917
Resíduo	224	0,0373		

\* Significativo ao nível de 1%. Nota: o resultado da aplicação do teste de Tukey está resumido na Tabela 1

Tabela A50 - Sumário da análise de variância para avaliação de logaritmo de ufc/mL para o microrganismo *Candida albicans*, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,0370	0,26	0,612
Concentração (2)	2	0,1180	0,83	0,438
Superfície (3)	1	1,6560	11,68	0,001 *
Saliva (4)	1	0,6050	4,27	0,040
(1) x (2)	2	0,5840	4,12	0,018
(1) x (3)	1	0,0750	0,53	0,468
(2) x (3)	2	0,0200	0,14	0,866
(1) x (4)	1	0,0070	0,05	0,823
(2) x (4)	2	0,0190	0,13	0,875
(3) x (4)	1	0,0160	0,11	0,736
(1) x (2) x (3)	2	0,1950	1,37	0,255
(1) x (2) x (4)	2	0,0040	0,03	0,971
(1) x (3) x (4)	1	0,0070	0,05	0,823
(2) x (3) x (4)	2	0,0070	0,05	0,951
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,0080	0,06	0,946
Resíduo	224	0,1420		

\* Significativo ao nível de 1%.

Tabela A51 - Sumário da análise de variância para avaliação de logaritmo de ufc/mL para o microrganismo *Candida glabrata*, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,0050	0,10	0,784
Concentração (2)	2	0,0080	0,10	0,889
Superfície (3)	1	0,7990	11,90	0,001 *
Saliva (4)	1	0,0490	0,70	0,395
(1) x (2)	2	0,1350	2,00	0,138
(1) x (3)	1	0,0190	0,30	0,596
(2) x (3)	2	0,0100	0,20	0,858
(1) x (4)	1	0,1180	1,80	0,186
(2) x (4)	2	0,0030	0,00	0,961
(3) x (4)	1	0,0350	0,50	0,474
(1) x (2) x (3)	2	0,2220	3,30	0,039
(1) x (2) x (4)	2	0,1190	1,80	0,174
(1) x (3) x (4)	1	0,0770	1,10	0,286
(2) x (3) x (4)	2	0,0860	1,30	0,283
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,0450	0,70	0,512
Resíduo	224	0,0670		

\* Significativo ao nível de 1%.

Tabela A52 - Sumário da análise de variância para avaliação de logaritmo de ufc/mL para o microrganismo *Streptococcus mutans*, para o teste de adesão do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,0070	0,10	0,745
Concentração (2)	2	0,0570	0,90	0,428
Superfície (3)	1	0,7090	10,60	0,001 *
Saliva (4)	1	0,1890	2,80	0,094
(1) x (2)	2	0,1380	2,10	0,129
(1) x (3)	1	0,0600	0,90	0,342
(2) x (3)	2	0,0140	0,20	0,816
(1) x (4)	1	0,1140	1,70	0,192
(2) x (4)	2	0,0210	0,30	0,731
(3) x (4)	1	0,0440	0,70	0,416
(1) x (2) x (3)	2	0,3120	4,70	0,010
(1) x (2) x (4)	2	0,0280	0,40	0,653
(1) x (3) x (4)	1	0,0680	1,00	0,314
(2) x (3) x (4)	2	0,0680	1,00	0,360
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,0210	0,30	0,731
Resíduo	224	0,0670		

• Significativo ao nível de 1%.

Tabela A53 - Sumário da análise de variância para avaliação de absorbâncias do método XTT, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,5656	9,77	0,002 *
Concentração (2)	2	0,9984	17,25	<0,001 *
Superfície (3)	1	2,0910	36,13	<0,001 *
Saliva (4)	1	1,8524	32,01	<0,001 *
(1) x (2)	2	0,2267	3,92	0,021
(1) x (3)	1	1,2361	21,36	<0,001 *
(2) x (3)	2	0,1703	2,94	0,055
(1) x (4)	1	0,1595	2,76	0,098
(2) x (4)	2	0,0057	0,10	0,906
(3) x (4)	1	0,2614	4,52	0,035
(1) x (2) x (3)	2	0,0426	0,74	0,480
(1) x (2) x (4)	2	0,1653	2,86	0,060
(1) x (3) x (4)	1	0,4069	7,03	0,009 *
(2) x (3) x (4)	2	0,2506	4,33	0,014
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,0345	0,60	0,552
Resíduo	224	0,0579		

\* Significativo ao nível de 1%. Nota: o resultado da aplicação do teste de Tukey está resumido na Tabela 3

Tabela A54 - Sumário da análise de variância para avaliação de logaritmo de ufc/mL para o microrganismo *Candida albicans*, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,3070	1,46	0,228
Concentração (2)	2	0,6420	3,06	0,049
Superfície (3)	1	1,3580	6,46	0,012
Saliva (4)	1	0,3890	1,85	0,175
(1) x (2)	2	0,1390	0,66	0,516
(1) x (3)	1	0,4550	2,17	0,142
(2) x (3)	2	0,0800	0,38	0,683
(1) x (4)	1	0,1580	0,75	0,387
(2) x (4)	2	0,2470	1,17	0,311
(3) x (4)	1	0,9120	4,34	0,038
(1) x (2) x (3)	2	0,0700	0,33	0,716
(1) x (2) x (4)	2	0,1980	0,94	0,392
(1) x (3) x (4)	1	0,0760	0,36	0,549
(2) x (3) x (4)	2	0,0820	0,39	0,677
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,4170	1,99	0,140
Resíduo	224	0,2100		

Tabela A55 - Sumário da análise de variância para avaliação de logaritmo de ufc/mL para o microrganismo *Candida glabrata*, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,0770	0,34	0,562
Concentração (2)	2	0,0220	0,10	0,909
Superfície (3)	1	0,7730	3,37	0,068
Saliva (4)	1	0,5100	2,23	0,137
(1) x (2)	2	0,2000	0,87	0,419
(1) x (3)	1	0,4810	2,10	0,149
(2) x (3)	2	0,1720	0,75	0,474
(1) x (4)	1	0,0310	0,13	0,714
(2) x (4)	2	0,2590	1,13	0,324
(3) x (4)	1	0,1260	0,55	0,459
(1) x (2) x (3)	2	0,0710	0,31	0,733
(1) x (2) x (4)	2	0,0800	0,35	0,706
(1) x (3) x (4)	1	0,0540	0,23	0,629
(2) x (3) x (4)	2	0,0700	0,30	0,738
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,2420	1,06	0,350
Resíduo	224	0,2290		

Tabela A56 - Sumário da análise de variância para avaliação de logaritmo de ufc/mL para o microrganismo *Streptococcus mutans*, para o teste de formação do biofilme multiespécies. Araraquara 2013.

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Verniz (1)	1	0,7230	2,22	0,137
Concentração (2)	2	0,0050	0,02	0,985
Superfície (3)	1	0,4380	1,35	0,247
Saliva (4)	1	1,3840	4,26	0,040
(1) x (2)	2	0,1270	0,39	0,676
(1) x (3)	1	0,9340	2,87	0,092
(2) x (3)	2	0,4010	1,23	0,293
(1) x (4)	1	0,4700	1,45	0,231
(2) x (4)	2	0,1080	0,33	0,718
(3) x (4)	1	0,0040	0,01	0,912
(1) x (2) x (3)	2	0,1910	0,59	0,556
(1) x (2) x (4)	2	0,0670	0,21	0,814
(1) x (3) x (4)	1	0,1510	0,47	0,496
(2) x (3) x (4)	2	0,2280	0,70	0,496
(1) x (2) x (3) x (4)	2	0,0770	0,24	0,788
Resíduo	224	0,3250		



*Anexo*

Anexo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

# Certificado

**Certificamos** que o projeto de pesquisa intitulado **"EFETIVIDADE DE VERNIZES FOTOPOLIMERIZÁVEIS EXPERIMENTAIS E DA ESCOVAÇÃO NA REDUÇÃO DA ADESÃO DE BIOFILME MULTI ESPÉCIES EM UMA RESINA PARA BASE DE PRÓTESE"**, sob o protocolo nº 12/10, de responsabilidade do Pesquisador (a) **TEUNICE TERESINHA GUIMARÃES**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 03 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

**Certify** that the research project titled **"EFFECTIVENESS OF EXPERIMENTAL LIGHT-CURED VARNISHES AND TOOTH BRUSHING IN REDUCING THE MULTI SPECIES BIOFILM TO A DENTURE BASE ACRYLIC RESIN"**, protocol number 12/10, under **Dr TEUNICE TERESINHA GUIMARÃES**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 03 (tree) year when the final review of this study will occur.

Araraquara, 4 de maio de 2010.

*MMS Nagle*  
**Prof. Dr. Mauricio Meirelles Nagle**  
 Coordenador

## **Autorização para reprodução**

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 17 de julho de 2013.

Fernanda Emiko Izumida