

Agda Marobo Andreotti

Influência da rugosidade de superfície e ação de diferentes desinfetantes na formação de biofilme em resina acrílica para prótese ocular e sua biocompatibilidade em contato com células da conjuntiva humana



ARAÇATUBA-SP

2017



Agda Marobo Andreotti

Influência da rugosidade de superfície e ação de diferentes desinfetantes na formação de biofilme em resina acrílica para prótese ocular e sua biocompatibilidade em contato com células da conjuntiva humana

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do
Grau de “Doutor em Odontologia” – Área de
Concentração Prótese Dentária.

Orientadora: Profª Adj. Daniela Micheline dos Santos

ARAÇATUBA-SP

2017



Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A559i Andreotti, Agda Marobo.
Influência da rugosidade de superfície e ação de diferentes desinfetantes na formação de biofilme em resina acrílica para prótese ocular e sua biocompatibilidade em contato com células da conjuntiva humana / Agda Marobo Andreotti. - Araçatuba, 2017
146 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Daniela Micheline dos Santos

1. Olho artificial 2. Resinas acrílicas 3. Biofilmes
4. Desinfecção 5. Toxicidade I. T.

Black D3
CDD 617.69

Dedicatória

A minha mãe **Marilze Marobo**, que sempre me apoiou e investiu em minha educação, me deu forças para continuar o caminho dos estudos e do trabalho, esteve sempre presente torcendo por mim e participando ativamente em cada passo da minha trajetória.

À minha avó **Alice Cavaca Marobo**, a quem devo todos os ensinamentos de amor e esperança, e toda gratidão pelos anos de dedicação e orações.

À minha tia **Marluce Marobo Dominato**, tio **Luiz Antonio Dominato** e minha prima **Bruna Marobo Dominato**, que estiveram comigo em cada dificuldade, e sempre me apoiaram e ajudaram em todos os momentos.

À minha tia e madrinha **Lúcia Helena Maroubó de Brito**, que sempre se preocupou comigo, me colocou em suas orações, e que mais do que nunca está agora em minhas orações diárias para superar um momento muito difícil.

E ao meu noivo **Lucas**, por sempre acreditar em mim, confiar no meu potencial e estar ao meu lado em cada passo dessa caminhada.

Agradecimentos Especiais

A Deus

Primeiramente agradeço a **Deus**, a força maior que rege meus pensamentos e atitudes diárias. Foram tantas as provações nesses anos de Pós-Graduação, que sem Sua presença em minha vida, eu não seria capaz de suportar. A gente sabe da importância da luz, no momento em que a gente está no escuro! Em inúmeras situações, o Senhor me mostrou a luz, me reergueu, me deu as mãos, acalentou meu coração. Encheu minha vida de pessoas especiais, me fez amada e querida, me presenteou com uma família indescritível e com um companheiro de vida abençoado. O Senhor me deu saúde física, mental e espiritual para que eu continuasse trilhando meus caminhos, passando por todas as pedras e sinuosidades. Hoje e sempre, sou grata por cada experiência que o Senhor me proporcionou, pelas minhas imperfeições e qualidades, por todas as vitórias e até mesmo as dificuldades, que me fizeram crescer e amadurecer. Ao Senhor, agradeço, dedico e entrego esse momento em que encerro mais um ciclo da minha vida. Obrigada meu Deus, meu Senhor, meu Pai Celestial.

“Pela tarde, vem o pranto, mas de manhã, volta a alegria. Eu, porém, disse, seguro de mim:

“Não serei jamais abalado”. Salmo 30

À minha **MÃE**

Difícil expressar tudo que sinto por você e demonstrar toda minha gratidão. Desde sempre fomos parceiras, amigas, mãe e filha, filha e mãe. Eu sei que os anos em que estive longe foram difíceis para você, sei que de madrugada você acordava para olhar se eu estava descoberta enquanto dormia, e de repente se lembrava que eu não estava lá, e seu coração doía apertadinho nessas horas. Você nunca se deixou abalar, para não me abalar, a fim de que eu pudesse seguir de onde estivesse. Mesmo na distância, nos fizemos sempre presentes na vida uma da outra. Sempre pensei em você, sempre busquei te fazer feliz e te encher de orgulho, sempre zelei pela educação que me deu como forma de agradecimento a tudo que faz por mim. Onde quer que eu vá, em qualquer canto desse mundo, encontro você. Deparo-me com suas palavras mágicas, sua sabedoria, fé, e sua confiança em mim. Você sempre foi o motivo de eu continuar batalhando pelas minhas conquistas. E eu só tenho a agradecer pelo amor incondicional, pelos momentos difíceis em que nos apoiamos, pelas vitórias comemoradas juntas, pela compreensão e entrega. Agradeço por muitas vezes abandonar seus anseios e esquecer-se de si mesma para lutar única e exclusivamente por mim, por entregar sua vida para dar a benção da minha. Que sigamos sempre juntas e unidas por toda vida. Obrigada MÃE, por ser a benção divina presente em minha vida. Eu te amo muito.

À minha **AVÓ ALICE**

Meu amor, minha fortaleza, minha rocha. Poderia te denominar de milhares de coisas, milhares de adjetivos e qualidades, mas nada seria fiel ao que você realmente é. Poucos são tão abençoados em ser “criados pela avó”, serem tão amados, poderem dividir a mesma casa, adquirir experiências, trocar receitas, aprender o dom e a beleza de conviver com um ser tão iluminado e cheio de amor, que há 87 anos habita essa Terra, minha vida e meu coração. Tão bom ouvir meu nome nos sussurros das suas orações, ver as velas acesas para as preces feitas por todos nós. Tão bom e inesquecível o seu: “Já vai sair? Então vai com Deus”. A senhora sabe que sem os seus cuidados eu não seria a pessoa que sou hoje. E talvez a senhora não saiba o quanto sou grata por tudo isso, o quanto reconheço sua entrega a mim, e o tamanho do meu amor pela senhora! Que Jesus continue te enchendo de saúde e de vida, para que a senhora continue rezando por nós, continue arrastando os chinelos pela casa e fazendo o cafezinho que eu amo, continue fazendo cachecol de tricô no sofá e enchendo meu mundo de alegria. A união da nossa família vem pela sua presença. À senhora, toda minha admiração, respeito, gratidão e o mais sincero amor. Te amo mais do que as velinhas dos seus aniversários podem contar.

“Só nos ama, só vai ficar até o fim, aquele que, depois da nossa utilidade, descobriu o nosso significado. Só o amor nos dá condições de cuidar do outro até o fim.”

Padre Fábio de Melo

Aos meus tios **Marluce** e **Luiz Antonio**, e minha prima **Bruna**

Por serem tão presentes em todos os momentos, por torcerem por mim como se eu fosse a própria filha de vocês, por me ajudarem em tudo que precisei, por estarem ao lado da minha mãe em todas as dificuldades que ela passou no caminho para minha educação, por nunca nos desamparar. O que vocês fizeram e ainda fazem por mim não tem preço ou agradecimento algum que pague.

Tia **Marluce**, quando Deus enviou uma irmã gêmea juntamente com minha mãe, Ele sabia exatamente como seria indispensável a presença de uma na vida da outra, e ainda pensou em me dar de presente uma segunda mãe e uma segunda família. Obrigada por toda sua entrega e dedicação a mim! Sei o quanto você já chorou comigo, em silêncio, pelos meus sofrimentos, ou vibrando pelas minhas conquistas. Amo você.

Tio **Luiz Antonio**, obrigada por ser a figura paterna todos esses anos na ausência do meu pai, por ser sempre solícito, disposto, preocupado comigo, pronto para qualquer coisa, desde me levar aos mais distantes destinos na época dos vestibulares até a pintar minha casa na época da mudança. Obrigada por fazer parte da nossa família. Amo você.

Bruninha, a famosa prima-irmã mais nova. Você me ensina todos os dias como ser exemplo pra alguém. Pra mim é um orgulho saber que você conta comigo e confia em mim. Admiro muito sua forma de pensar, de agir, de enxergar a vida. Aprendo mais que ensino. Obrigada por ser minha amiga, minha irmãzinha, confidente. Obrigada por sempre torcer por mim e por estar sempre presente, mesmo distante. Que seu caminho seja cheio de luz. Te amo muito.

À minha tia e madrinha **Lúcia**

Você, pra mim, é um exemplo de mulher, de mãe, de avó, de esposa. Queria ter só um pouquinho da força que você tem para lutar todos os dias, para nadar contra a corrente e provar pra todo mundo que você pode mais do que os problemas. Me emociona muito sua história de vida e só tenho o desejo imenso de que você seja retribuída por Deus por tudo que já enfrentou e está enfrentando. Sinto grande gratidão por todas as suas orações e votos para que eu esteja sempre protegida e bem encaminhada. Os bens de espírito são maiores do que os bens materiais. Sei que está passando por um momento difícil, desses que abalam toda nossa estrutura, e até mesmo a fé e a esperança. Eu sei que às vezes parece que esse caminho não vai ter fim, mas acredite, ele vai acabar. Mesmo a mais terrível das tempestades tem um final. Não perca a esperança e a fé, nunca! Elas serão suas aliadas quando o desespero tentar se apossar da sua alma. Pense que as coisas acontecem por alguma razão, que mesmo as coisas menos boas têm uma razão de ser e encaminharão você para algo melhor. Use a sua força para criar um sorriso neste momento. Em breve estará sorrindo com o coração, e festejando a ação de Deus na sua vida e na sua superação. Eu te amo muito!!

“É Deus, que te faz entender toda poesia, que torna mais valiosa a vida, e prova que ainda dá pra ser feliz. Apenas atenda quem chama, e peça que nesta noite Ele te toque, e cure todas suas feridas, e vele o sono e espere acordar. Amanhã será um novo dia.”

Rosas de Saron

Ao meu pai **Waldir** (*in memoriam*)

E mais uma vez eu não poderia deixar de agradecer ao meu anjo que está no céu olhando por mim. Já são quase 5 anos sem você, sem sua presença física aqui na Terra. Mas dentro do meu coração e nas minhas mais doces lembranças você estará sempre presente. Quando eu fui aprovada para começar o Mestrado, você disse que a partir dali sua vida começaria. E começou, de fato, junto ao Nosso Pai, na paz e bondade que você sempre mereceu. Hoje, em mais um dia especial, dedico a você essa vitória. Sei que você está torcendo por mim, me amparando junto a Deus, me mandando todo seu amor daí de cima. Tenho em minha memória, um momento inesquecível. Nos seus últimos dias, perguntei se você me amava. A traqueostomia te impediu de falar em palavras, mas vi em seus olhos, o maior amor do mundo. Todo amor de um pai, o amor do Pai. Naquele momento soube mais do seu amor por mim, do que em qualquer outra manifestação verbal. E soube que você poderia partir em paz, pois sabia que meu amor era recíproco na mesma intensidade. Te amo muito!

À minha *família*

Agradeço imensamente a toda minha família, que sempre me apoiou. Obrigada por compreenderem a minha ausência nos anos de estudo e dedicação à minha carreira e por sempre se alegrarem quando eu voltava pra casa. Obrigada por sempre se fazerem presentes mesmo quando estávamos fisicamente distantes. Sou muito abençoada por ter vocês em minha vida, por fazer parte dessa família, e por estar pertinho agora, podendo dividir e viver grandes momentos ao lado de vocês. Agradeço por serem o exemplo de pilar, união e comunhão que quero levar pra criação da minha própria família. O que sou hoje é influência de tudo que aprendi com vocês. A todos vocês: **Tia Maria Ignez, Rubens, Andressa, Fábio, Guilherme, Alan, Patrícia, Tio Tércio, Marcel, Denise, Thaiza, José Ricardo, Alice e Carolina**, meus sinceros agradecimentos e todo meu amor. Amo muito vocês.

Ao meu amor, meu noivo **Lucas**

Meu amor, que sorte a minha por termos nos reencontrado, e por ter uma pessoa tão especial e verdadeira ao meu lado. Só tenho a agradecer por você sempre me apoiar em todas as decisões, por ser tão compreensivo, tolerante, companheiro. Você completa minha vida, preenche todos os vazios, me faz sentir inteira. Obrigada por ser esse ser humano incrível, com um coração gigante e puro que eu tanto admiro e que me conquista todos os dias. Obrigada pelo respeito, pela cumplicidade, por ser meu porto seguro nos momentos mais difíceis e por comemorar comigo todas as conquistas. Por ficar feliz quando eu estou feliz, por me fazer feliz quando estou triste. Obrigada por cuidar de mim, me proteger, me mimar, me incentivar. Obrigada por despertar em mim os melhores sentimentos e por me enxergar melhor do que eu sou. Obrigada por ter me escolhido como a mulher que vai passar o resto da vida com você. Deus acertou em cheio, e continua acertando, em tudo que planejou pra nós. Te amo muito, meu amor.

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

Fernando Pessoa

À minha **orientadora**

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora **Professora Adj. Daniela Micheline dos Santos**. Dani, foi um imenso prazer trabalhar com você todos esses anos, desde a graduação, quando decidi que queria ingressar na área de prótese, e você me acolheu como aluna de Iniciação Científica, em seguida como aluna de Mestrado, e finalmente no Doutorado. Em todos esses anos passamos por muitos momentos difíceis e também maravilhosos. Você sempre me incentivou, acreditou em mim, compreendeu meus desesperos e aflições. Sempre conseguiu o respeito de ser professora e orientadora, sem perder a doçura de um ser humano admirável e uma grande amiga. Quando você sugeriu que no Doutorado eu trabalhasse com microbiologia e citotoxicidade, no início fiquei um pouco assustada, pois tudo era totalmente novidade para mim, mas com isso, você foi a responsável por me fazer enxergar o quanto eu sou capaz de aprender e a força que tenho para não desistir frente às dificuldades. Hoje sou uma profissional, uma pesquisadora e até um ser humano melhor, pois você instigou em mim essa garra e persistência, semelhante a você, que também nunca desistiu de seus sonhos. Obrigada de coração por acreditar que eu fosse capaz de seguir em frente com esse projeto, mesmo quando eu mesma não acreditava; por me dar todo apoio e respaldo, tanto profissionalmente quanto emocionalmente; por me ensinar tanto. Que possamos, em um futuro breve, sermos colegas de profissão no nível acadêmico, e que eu consiga passar para meus alunos tudo que aprendi com você. Sou muito grata por ser sua aluna e sua orientada. Deus não poderia ter escolhido melhor! A você, todo meu carinho, admiração, respeito e gratidão.

À Professora Ass. Dr. **Cristiane Duque**, por ter me recebido tão bem e de braços abertos no laboratório de microbiologia do Departamento de Odontologia Infantil e Social. Desde o início você foi sempre muito solícita, pronta para ajudar e resolver nossas dúvidas em qualquer momento. Imediatamente prontificou seus alunos a nos ensinar a trabalhar com a Microbiologia, e muitas vezes nos ajudou com as próprias mãos nos experimentos. Sua dedicação com a pesquisa é algo contagiante e sua atenção com o meu trabalho foi algo sem igual durante todo o tempo em que trabalhamos em conjunto. Não mediu esforços para que nos sentíssemos acolhidos no laboratório, de forma que foi um prazer trabalhar com você. Obrigada por ser essa pessoa tão especial e por ter me ensinado tanto. Você é uma pesquisadora, professora e um ser humano incrível. A você toda minha gratidão, respeito e admiração. Obrigada por tudo.

A todos os alunos do Departamento de Odontopediatria, em especial à **Juliana Carvalho**, que foi a principal responsável por eu aprender tudo que sei sobre a metodologia dos trabalhos com microbiologia. Obrigada por ter me ensinado com a maior boa vontade, por muitas vezes deixar seus compromissos para poder me ajudar, por ter inclusive passado finais de semana comigo no laboratório trabalhando para a execução desse trabalho. Todo sucesso do mundo a você. E meus sinceros agradecimentos.

Às minhas parceiras **Cecília Alves Sousa**, **Débora Biléco** e **Letícia Gonçalves**. Na época da realização desse trabalho, todas eram alunas de Iniciação Científica e cada uma participou ativamente de uma parte desse projeto. Gostaria de agradecer imensamente a vocês por terem confiado a mim os seus trabalhos de Iniciação Científica, por termos trabalhado em conjunto em cada etapa de realização dessa pesquisa, por terem tido paciência comigo, pela responsabilidade, pelo comprometimento e compreensão. Obrigada pelos momentos de amizade e pela companhia nos momentos de trabalho intenso nos laboratórios. Obrigada por me permitirem sentir um pouquinho do gosto de orientar um aluno. Se não fosse com o

auxílio de vocês, esse trabalho não teria sido concluído com sucesso. Muito obrigada por tudo! Muito sucesso a vocês sempre!!

À Professora Adj. Dr. **Sandra Helena Penha de Oliveira**, por ter aberto as portas do laboratório do Departamento de Ciências Básicas, para que pudéssemos aprender e desenvolver nossos trabalhos. Obrigada por estar sempre pronta para nos ensinar, nos ajudar em tudo que foi preciso, nos receber em sua sala, tirar nossas dúvidas. Obrigada por disponibilizar e designar seus alunos a nos orientarem em todos os processos metodológicos dos experimentos. Obrigada por ser essa pessoa incentivadora, divertida, admirável. Só tenho a agradecer por ter tido a oportunidade de ser sua aluna na graduação e de poder ter te conhecido melhor no Doutorado. Foi um prazer trabalhar com a senhora. Meu respeito, admiração e gratidão. Obrigada por tudo.

Aos alunos do departamento de Ciências Básicas, em especial, **Aline Takamiya** e **Victor Balera**, por todo o apoio durante a realização desse trabalho, pelos conselhos e ensinamentos compartilhados, pela paciência e disponibilidade. Obrigada por me receberem tão bem, por estarem sempre dispostos a me auxiliar na execução do experimento, por não medirem esforços para me ajudar. Sem a ajuda de vocês, não seria possível concluir esse trabalho. Obrigada por tudo.

Aos professores Dr. **Elidiane Cipriano Rangel** e Dr. **Nilson Cristino da Cruz**, e ao técnico de laboratório **Rafael Parra Ribeiro**, da UNESP-Campus de Sorocaba, pela disponibilidade em nos auxiliar durante o período de testes de rugosidade, abrindo as portas do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais e Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) para que pudéssemos realizar nossas análises.

Aos professores **Valentim Adelino Ricardo Barão**, da FOP-UNICAMP e **Marcela Filié Haddad**, da UNIFAL, **Cristiane Duque** e **Sandra Helena Penha de Oliveira**,

professoras da casa, que compõem a minha **banca examinadora**, por terem aceitado o meu convite e por me proporcionarem o privilégio de compartilhar seus conhecimentos comigo. Obrigada pela presença, amizade, disponibilização de tempo, por terem se deslocado até Araçatuba, por todas as considerações e atenção despendida na análise deste trabalho.

Ao Professor Titular Doutor **Marcelo Coelho Goiato**. Obrigada por ser o idealizador de tantos projetos no nosso departamento e no nosso grupo de pesquisa. Agradeço imensamente por sempre nos incentivar, sempre nos cobrar de uma forma respeitosa, por ser esse profissional e pesquisador incrível. Obrigada por nos motivar com sua força de vontade, com seu profissionalismo e humildade. Obrigada por todos os ensinamentos, todas as palavras a mim referidas, todo carinho e dedicação a nós. Agradeço de coração a oportunidade de ter trabalhado com o senhor. Muito obrigada por tudo!

À Professora Ass. Dr **Aimee Maria Guiotti**, por ter nos auxiliado no desenvolvimento do projeto de microbiologia, por ter nos disponibilizado seu tempo, materiais e conhecimento. Por ser sempre tão carinhosa e solícita em todos os momentos. Obrigada por tudo.

À minha amiga **Adhara**. São anos de semelhanças e diferenças, desentendimentos e entendimentos, festas, trabalho, viagens, conversas, risadas, discussões, estudos. Mas acima de tudo, companheirismo, parceria, cumplicidade, gratidão. Gratidão por me ajudar nos momentos mais difíceis, por estar comigo nos mais divertidos. Amiga, muito obrigada por ser essa pessoa tão especial e essencial em minha vida, por me hospedar na sua casa todos os meses, por me receber tão bem, por nunca ter me deixado na mão. Obrigada por dividir comigo tantos momentos e experiências. Por estar presente mesmo na distância. Mais uma vez estamos finalizando uma fase que começamos juntas, e é uma alegria imensa dividir essa conquista com você. Desejo a você tudo de melhor nesse mundo. Te amo.

À minha amiga **Hiskell**, por ter se tornado tão especial em tão pouco tempo, por estar sempre pronta para se doar a qualquer momento. Admiro muito a bondade do seu coração, a forma como se desdobra para ajudar quem precisa, a sua força de vontade, sua sinceridade, sua prontidão. Para mim, você foi um dos grandes presentes dos meus últimos anos em Araçatuba, e agradeço imensamente Deus ter te colocado em minha vida. Te amo amiga.

À minha amiga **Emily**. Sem palavras para agradecer tudo que você fez por mim, todo o tempo que dedicou em me ajudar e me ensinar. Admiro muito sua responsabilidade, seu interesse, sua inteligência e força de vontade. Sempre muito correta, determinada, resignada. Muito obrigada por toda sua ajuda e pela sua amizade! Foi um prazer imenso poder te conhecer e trabalhar com você. Muita sorte nessa nova fase em Toronto. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos de pós-graduação, **Mariana Vilela, Caroline Cantieri, Fernanda, Sandro, Aljomar**, pela amizade, convivência e trocas de experiência. Agradeço especialmente à **Liliane Bonatto Drumond** e **Rodrigo Antonio de Medeiros**, por sempre estarem presentes, me ajudando, me levando e buscando em todos os lugares, serem tão carinhosos e solícitos. E aos hoje professores **Marcela Haddad, Aldieris Pesqueira e Amalia Moreno**, por todos os momentos de convivência e amizade.

Aos meus amigos **Jéssica Quereza** e **Régis Alexandre**, por se tornarem tão especiais nos últimos anos que vivi em Araçatuba, por todos os momentos maravilhosos, felizes, engraçados, reflexivos, de altas conversas, que passamos juntos! Aos meus amigos de Cândido Mota, especialmente **Vinícius** e **Cristiane**, e minha cunhada e amiga **Cristal**. Vocês sabem como são especiais pra mim e como foram importantes e indispensáveis no meu retorno à Cândido Mota. Obrigada por todos esses anos de amizade que resistiram aos tantos anos de distância que nos separaram. Amo todos vocês!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** em nome do **diretor Prof. Titular Dr. Wilson Roberto Poi** e do **Vice-Diretor Prof. Titular Dr. João Eduardo Gomes Filho**, por me proporcionar toda a estrutura necessária para que pudesse desenvolver meus projetos profissionais, por me acolher tão bem em todos os anos que tive o prazer de ser aluna da casa, como graduanda, mestranda e finalmente como doutoranda.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa do coordenador **Prof. Adj. Dr André Luiz Fraga Briso**, pelo empenho em fazer com que nossa faculdade seja reconhecida no mundo científico e pela oportunidade de realizar os cursos de Mestrado e Doutorado em Odontologia, na área de Prótese Dentária.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela valiosa contribuição financeira para a realização dessa pesquisa.

Aos Departamentos de **Materiais Odontológicos e Prótese**, de **Ciências Básicas** e de **Odontologia Infantil e Social** da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, ao **Laboratório de Plasmas Tecnológicos**, da **UNESP de Sorocaba**, e à **UNESP de Ilha Solteira** pela acolhida, pelos funcionários, pelo espaço e pela estrutura para desenvolver nossos trabalhos.

Epígrafe

*“Os limites do mundo os meus pés não ultrapassam,
mas o que de mais alto existe, minha alma alcança.”*

(Padre Fábio de Melo)

Andreotti AM. Influência da rugosidade de superfície e ação de diferentes desinfetantes na formação de biofilme em resina acrílica para prótese ocular e sua biocompatibilidade em contato com células da conjuntiva humana [tese]. Araçatuba: Faculdade De Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2017.

Resumo Geral

O controle da formação de biofilme é essencial para manter a saúde da cavidade anoftálmica dos portadores de prótese ocular. As propriedades físicas da resina acrílica, como a sua rugosidade, podem interferir na adesão de microrganismos nas próteses e na formação de biofilmes. Sendo assim, é necessário utilizar soluções de limpeza eficazes e que não causem irritação tecidual na conjuntiva ocular. O objetivo desse trabalho foi verificar a influência da rugosidade de superfície da resina acrílica utilizada na confecção de próteses oculares na formação de biofilme bacteriano, bem como avaliar a eficácia antimicrobiana e citotoxicidade de diferentes soluções para desinfecção de próteses oculares. Para a análise da rugosidade, corpos de prova de resina acrílica foram confeccionados e divididos em 5 grupos de acordo com a granulação de lixa de polimento utilizada: 120, 400, 800, 1200 e 1200S (lixa + sílica). A rugosidade dos corpos de prova foi mensurada por meio de perfilômetro e imagens de Microscopia de Força Atômica foram obtidas para cada grupo. O crescimento das espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* sobre os corpos de prova foi avaliado após 4 e 24h, por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. O efeito dos seguintes tratamentos: soro fisiológico, sabão neutro, clorexidina 4%, pastilhas efervescentes *Efferdent*®, triclosan 1% e citronela sobre biofilme formado sobre os corpos de prova de resina acrílica também foi avaliado por meio da determinação do número de UFC/mL. A citotoxicidade dos agentes antimicrobianos foi avaliada por meio dos testes de MTT e Neutral Red, após tratamento dos corpos de prova, diariamente, por 1, 7, 15, 30, 60 e

90 dias com as soluções já citadas, sendo avaliados ao fim de cada período. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística adequada, considerando se provinham de dados paramétricos ou não paramétricos. Os resultados demonstraram que os menores valores de rugosidade foram encontrados no grupo 800, 1200 e 1200S. A contagem microbiana foi menor no grupo 1200S e esta diferiu estatisticamente ($p>0,05$) do controle para ambos os tempos de avaliação e bactérias. Na análise da ação antimicrobiana das soluções para desinfecção, todos os protocolos promoveram redução do crescimento dos microrganismos testados comparados ao controle (crescimento sem a presença do antimicrobiano), sendo que os grupos submetidos ao tratamento com clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent® e triclosan 1% eliminaram o biofilme ($p>0,01$). Ainda nos ensaios de citotoxicidade, em todos os grupos foi observada proliferação celular das células da conjuntiva acima de 84% ($p>0,05$). Dessa forma, conclui-se que a rugosidade não interfere significativamente na adesão bacteriana e formação de biofilme, exceto para o grupo 1200S, e que os protocolos de limpeza com imersão em clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent® e triclosan 1% são totalmente eficazes na desinfecção e não apresentam citotoxicidade para com as células da conjuntiva humana, sugerindo sua indicação para desinfecção de próteses oculares.

Palavras-chave: Olho Artificial; Resinas Acrílicas; Propriedades de Superfície; Biofilmes; Desinfecção; Toxicidade.

Andreotti AM. Influence of surface roughness and action of different disinfectants on the formation of biofilm in acrylic resin for ocular prosthesis and their biocompatibility in contact with cells human conjunctiva cells [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2017.

Abstract Geral

The control of biofilm formation is essential to maintain the health of anophthalmic cavity of ocular prosthesis wearers. The physical properties of the acrylic resin, such as surface roughness, may interfere with the adhesion of microorganisms to the prostheses. Therefore, it is necessary to use cleaning solutions that are effective and do not cause tissue irritation in ocular conjunctiva. The aim of this study was to verify the influence of surface roughness of the acrylic resin used in the preparation of ocular prosthesis in the formation of bacterial biofilm, as well as to evaluate the antimicrobial efficacy and cytotoxicity of different disinfectants in ocular prostheses. For roughness analysis, acrylic resin samples were prepared and divided into 5 groups according to the granulation of polishing sandpaper used: 120, 400, 800, 1200 and 1200S (sandpaper + silica). The roughness of the samples was measured using a profilometer and Atomic Force Microscopy images were obtained for each group. The microbial growth for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on the samples was evaluated after 4 and 24 h by counting the Colony Forming Units (CFU)/mL. The effect of the following solutions was also evaluated by CFU/mL: non treated group (immersed in saline solution), neutral soap, 4% chlorhexidine, Efferdent® effervescent tablets, 1% triclosan and citronella. The cytotoxicity of the solutions was evaluated by MTT and Neutral Red after treating the samples daily for 1, 7, 15, 30, 60 and 90 days with the solutions already mentioned, being evaluated at the end of each period. Data were submitted to proper statistical analysis, considering whether data were parametric or non-parametric. The results

showed that the lowest roughness values were found in groups 800, 1200 and 1200S. 1200S group also presented the lowest values of microbial growth statistically different from control group ($p>0,05$), for both periods and bacteria evaluated. In the analysis of the solutions, compared to the control group (microbial growth without the presence of the antimicrobial), all protocols promoted a reduction in the growth of the microorganisms, and the groups submitted to disinfection with 4% chlorhexidine, Efferdent® effervescent tablets and 1% triclosan eliminated the biofilm ($p>0,01$). In addition, all groups showed cell proliferation of conjunctival cells above 84% in the cytotoxicity assays ($p>0,05$). Thus, it was concluded that the roughness does not significantly interfere in the adhesion of the microorganisms, except for group 1200S, and that the cleaning protocols with 4% chlorhexidine, Efferdent® effervescent tablets and 1% triclosan are totally effective in the disinfection and do not present cytotoxicity with human conjunctive cells, what suggests their indication for cleaning of ocular prosthesis.

Key Words: Eye, Artificial; Acrylic Resins; Surface Properties; Biofilms; Disinfection; Toxicity.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1: Imagens representativas da MFA: **A)** grupo polido com lixa de granulação 120; **B)** grupo polido com lixa de granulação 400; **C)** o grupo polido com lixa de granulação 800; **D)** grupo polido com lixa de granulação 1200; **E)** grupo polido com lixa de granulação 1200 e disco de feltro associado à solução de sílica (1200S). 49

Figura 2: Média (DP) da contagem das UFC/mL (em escala logarítmica) de *S. aureus* para cada grupo, após 4 e 24h de crescimento. *Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada microrganismo separadamente, de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$ 50

Figura 3: Média (DP) da contagem das UFC/mL (em escala logarítmica) de *S. epidermidis* para cada grupo, após 4 e 24h de crescimento. *Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada microrganismo separadamente, de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$ 51

Lista de Figuras

CAPÍTULO 2

Figura 1. Médias (desvio-padrão) das porcentagens de redução de *S. aureus* e *S.epidermidis* após tratamento com os agentes antimicrobianos. *Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada microrganismo separadamente, de acordo com os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p<0.01$ 86

Figura 2: Média $\pm$ desvio padrão dos percentuais de proliferação celular obtidos pela análise com MTT, após a exposição das culturas de células da conjuntiva humana aos extratos de resina acrílica submetida aos tratamentos antimicrobianos por diferentes períodos. *Letras diferentes para cada período indicam diferença estatística ($p<0,05$), de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni, entre cada grupo de agente antimicrobiano e o respectivo controle negativo (grupo não estimulado)..... 88

Figura 3: Média $\pm$ desvio padrão dos percentuais de proliferação celular obtidos pela análise com NEUTRAL RED, após a exposição das culturas de células da conjuntiva humana aos extratos de resina acrílica submetida aos tratamentos antimicrobianos por diferentes períodos. *Letras diferentes para cada período indicam diferença estatística ($p<0,05$), de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni, entre cada grupo de agente antimicrobiano e o respectivo controle negativo (grupo não estimulado)..... 90

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Valores médios (desvio padrão) de Rugosidade Ra (μm) da resina acrílica, de acordo com a lixa de polimento utilizada.....	48
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Procedimentos realizados nos corpos de prova de resina acrílica.....	79
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

et al. = E colaboradores

MFA: Microscopia de Força Atômica

UFCs: Unidades Formadoras de Colônias

h: horas

AFM: Atomic Force Microscopy

CFUs: Colony Forming Units

mm: milímetros

Ltda = Limitada

Kg = Quilograma

F: força

min: minutos

EUA: Estados Unidos da América

C° = Graus Celsius

USA: United States of America

log: logarítmica

DO: densidade óptica

mL = Mililitros

BHI: Brain Heart Infusion

SP: São Paulo

kHz : quilohertz

W: Watts

PR: Paraná

µl: microlitros

CA: California

nm: nanometro

µm: micrometros

MTT : 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio

NR: Neutral Red

% = Porcento

UV = Radiação ultravioleta

< = Menor

> = Maior

DP = Desvio Padrão

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	29
2. CAPÍTULO 1. INFLUÊNCIA DA RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO EM RESINA PARA PRÓTESE OCULAR	33
2.1 RESUMO.....	34
2.2 ABSTRACT.....	35
2.3 INTRODUÇÃO.....	36
2.4 PROPOSIÇÃO.....	39
2.5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.6 RESULTADOS.....	47
2.7 DISCUSSÃO.....	52
2.8 CONCLUSÃO.....	57
2.9 REFERÊNCIAS.....	59

3. CAPÍTULO 2. EFEITO DE DIFERENTES AGENTES ANTIMICROBIANOS	
SOBRE BIOFILME EM RESINA ACRÍLICA PARA PRÓTESE OCULAR E	
NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DA CONJUNTIVA HUMANA.....	65
3.1 RESUMO.....	66
3.2 ABSTRACT.....	68
3.3 INTRODUÇÃO.....	70
3.4 PROPOSIÇÃO.....	74
3.5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
3.6 RESULTADOS.....	85
3.7 DISCUSSÃO.....	92
3.8 CONCLUSÃO.....	100
3.9 REFERÊNCIAS.....	102
4. ANEXOS	111
4.1 Referências da Introdução Geral.....	112
4.2 Normas do periódico LETTERS OF APPLIED MICROBIOLOGY , para	
envio do artigo referente ao Capítulo 1	117
4.3 Normas do periódico BIOFOULING para envio do artigo referente ao	
Capítulo 2	135



INTRODUÇÃO GERAL



1. INTRODUÇÃO GERAL

A prótese ocular é considerada um importante tratamento reabilitador para pacientes que foram submetidos à perda total ou parcial do globo ocular devido a trauma, neoplasias ou deformações congênitas (1). Entretanto, os usuários de prótese ocular são susceptíveis a infecções, inflamações e traumas relacionados a modificações fisiológicas e morfológicas da cavidade anoftálmica; mobilidade prejudicada devido instalação inadequada da prótese; higienização da prótese negligenciada sem remover a prótese da cavidade por meses ou anos e sem lavá-la; acúmulo de secreção, que pode causar conjuntivite papilar e intolerância ao uso da prótese, levando à colonização da cavidade e da prótese ocular por microbiota patogênica (2).

Ao redor do mundo, a frequência e o tipo das patologias oculares podem variar de acordo com a idade, gênero, clima, acesso à saúde e com a própria população de pacientes. De acordo com Willcox et al. (2013) (3), os estafilococos são as bactérias mais comuns isoladas da conjuntiva, pálpebras, lágrimas, ou mesmo da superfície interna das próteses e da cavidade anoftálmica, sendo as espécies mais frequentes o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (2,3). Esses microrganismos estão diretamente relacionados a casos de ceratite bacteriana, conjuntivites, endoftalmites, blefarite crônica, queratite, entre outros (4-6), além de terem a capacidade de se aderir e proliferar em uma grande variedade de superfícies, incluindo superfícies acrílicas. Dessa forma a prótese ocular pode se tornar um reservatório para esses patógenos (7).

Recentemente, existe um grande número de relatos a respeito do impacto das propriedades físicas dos materiais na adesão bacteriana e uma relação particularmente forte entre a adesão bacteriana e rugosidade de superfície tem sido destacada (8-15). Considera-se que a rugosidade do material é uma propriedade relevante para o processo de adesão celular, já que as irregularidades da superfície polimérica promovem um aumento da área de

superfície e depressões que fornecem sítios mais favoráveis para colonização, tais como fendas ou fissuras que protegem as células contra as forças de cisalhamento (8,16). Uma vez que o comportamento de adesão microbiana em polímeros depende do microrganismo colonizador e supostamente da rugosidade de superfície do material, verifica-se a importância de avaliar a relação da rugosidade de superfície de resinas acrílicas para prótese ocular na adesão de diferentes microrganismos.

O controle da formação de biofilme é muito importante para manter a saúde da cavidade anoftálmica dos portadores de prótese ocular e pode ser realizado (17-19) por meio de técnicas de limpeza e desinfecção diárias com produtos facilmente encontrados no mercado, como, por exemplo, o sabão neutro, entre outros.

Dentre as soluções potencialmente antimicrobianas aplicadas na desinfecção de próteses oculares, destaca-se a clorexidina, um agente antimicrobiano de amplo espectro que tem sido muito utilizado na pele, mucosa e cavidade oral como desinfetante devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática (2,17,18); sabonetes antissépticos também podem ser usados na limpeza/desinfecção das próteses oculares, uma vez que a maioria deles apresenta em sua composição o triclosan, um importante agente antimicrobiano (20)

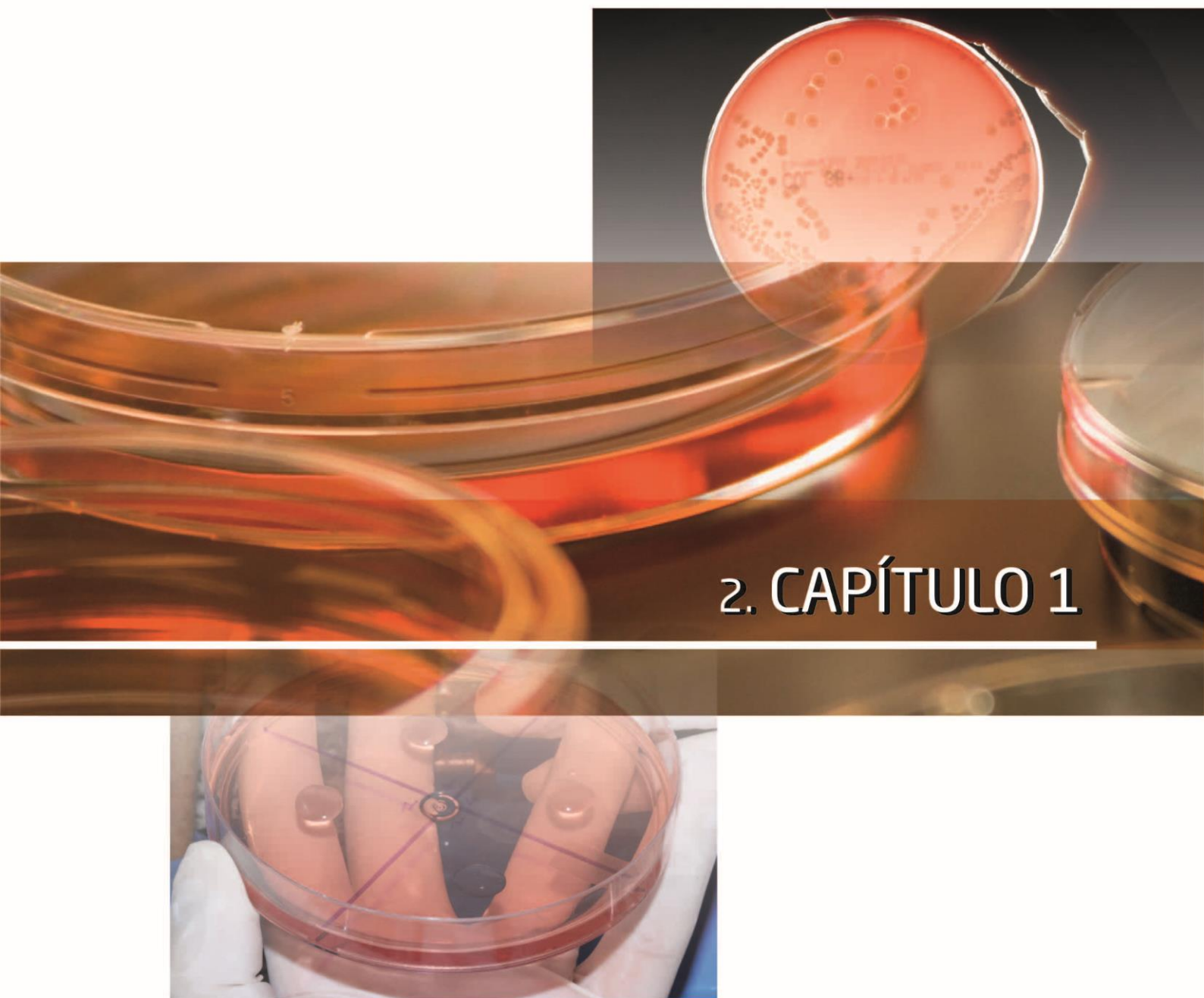
O uso pastilhas efervescentes como as utilizadas para desinfecção de próteses removíveis intra-orais também tem sido relatado, demonstrando resultados satisfatórios (17,18,21,22) e, uma alternativa inovadora a ser pesquisada, é o uso de fitoterápicos conhecidos por sua atividade antimicrobiana, sendo de baixo custo e fácil utilização, como por exemplo, a citronela (23-28).

Embora a desinfecção da prótese seja imprescindível, após o uso do desinfetante, o paciente pode não enxaguar corretamente a prótese antes de colocá-la de volta na cavidade anoftálmica. Ainda, a prótese ocular confeccionada em resina acrílica pode, ao longo do tempo, acumular substâncias em sua superfície, as quais podem vir a ser liberadas para a

cavidade, possivelmente causando algum dano à mucosa (29). A maioria dos produtos químicos em contato direto com a pele ou mucosa podem ser potencialmente irritantes. Essas considerações são diretamente aplicadas aos agentes antissépticos, que geralmente apresentam propriedades irritantes aos tecidos (30).

Ainda que o potencial tóxico dessas substâncias já tenha sido testado em muitos tipos de células (31-34), não há dados na literatura a respeito de sua toxicidade nas células da conjuntiva ocular humana, sendo este um dos únicos tecidos que permanece após a ressecção cirúrgica do globo ocular. Testes *in vitro* da citotoxicidade são importantes para avaliar segurança e biocompatibilidade na utilização de substâncias em seres humanos. O método de cultura de células, por exemplo, é um teste relativamente simples de ser executado, é reprodutível, pode ser cuidadosamente controlado e possui adequado custo-benefício (35,36).

Com base nas afirmações acima, esse estudo justifica-se pela importância de avaliar a interferência da rugosidade de superfície na adesão dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na superfície de resina acrílica utilizada na confecção de próteses oculares, bem como avaliar a eficácia antimicrobiana contra esses microrganismos e a citotoxicidade de diferentes soluções desinfetantes utilizadas na higienização de próteses oculares previamente à sua indicação.



2. CAPÍTULO 1

*O artigo referente ao Capítulo 1 será formatado de acordo com as normas do periódico Letters Of Applied Microbiology, contidas no ANEXO 4.2

INFLUÊNCIA DA RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO EM RESINA PARA PRÓTESE OCULAR

2.1 RESUMO

Esse estudo teve como objetivo avaliar a influência da rugosidade de superfície de resina acrílica utilizada na confecção de próteses oculares na formação de biofilme de duas espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Os corpos de prova de resina acrílica foram divididos em 5 grupos de acordo com a granulação de lixa de polimento utilizada: 120, 400, 800, 1200 e 1200S (lixa + feltro + sílica). A rugosidade foi mensurada por meio de perfilômetro e imagens de Microscopia de Força Atômica (MFA) foram obtidas para cada grupo. A avaliação do crescimento microbiano sobre os corpos de prova foi feita por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs)/mL, após 4 e 24 h de incubação. Considerando-se a rugosidade Ra, os grupos 120 e 400 foram estatisticamente diferentes entre si e em relação aos outros grupos, sendo o grupo 120 o que apresentou o maior valor de rugosidade, seguido pelo grupo 400. Os menores valores de rugosidade foram encontrados nos grupos 800, 1200 e 1200S, o que coincide com as imagens obtidas na MFA. Em relação a contagem das UFC/mL, apenas o grupo 1200S mostrou os menores valores de crescimento microbiano, estatisticamente diferente do controle, para ambos os microrganismos e tempos de avaliação. Conclui-se que as diferentes rugosidades não interferiram estatisticamente no crescimento microbiano sobre a superfície da resina acrílica.

Palavras chave: Olho Artificial; Resinas Acrílicas; Propriedades de Superfície; Biofilmes.

INFLUENCE OF SURFACE ROUGHNESS ON MICROBIAL BIOFILM FORMATION ON OCULAR PROSTHESIS ACRYLIC RESIN

2.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of surface roughness of acrylic resin used in ocular prosthesis in the biofilm formation of two bacterial species: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Acrylic resin samples were divided into 5 groups according to polishing sandpaper granulation: 120, 400, 800, 1200 and 1200S (sandpaper + silica). Surface roughness was measured by a profilometer and surface images obtained with Atomic Force Microscopy (AFM). Microbial growth was evaluated after 4 and 24h of incubation, by counting of Colony Forming Units CFU/mL. Considering roughness, groups 120 and 400 were statistically different from each other and in relation to the other groups, with Group 120 presenting the highest roughness value, followed by Group 400. The smallest roughness values were found in Groups 800, 1200 and 1200S, which coincides with images presented in MFA. Regarding CFU/mL, only group 1200S showed the lowest values of bacterial growth, significantly different from control, for both microorganisms. In conclusion, except for group 1200S, different surface roughness did not statistically interfere with microbial adhesion and growth on ocular prosthesis acrylic surfaces.

Key Words: Eye, Artificial; Acrylic Resins; Surface Properties; Biofilms.



2.3 INTRODUÇÃO



2.3 INTRODUÇÃO

A prótese ocular é uma excelente opção para reabilitação de pacientes anoftálmicos, podendo ser confeccionada, , em resina acrílica. Embora a prótese ocular possa estar adequadamente adaptada na cavidade anoftálmica, na maioria dos casos observa-se um “espaço morto” entre a superfície posterior da mesma e o fundo da cavidade. A secreção lacrimal, muco e resíduos estagnados nesse espaço constituem excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano (1).

De acordo com Willcox et al. (2013)(2), os estafilococos são as bactérias mais comuns isoladas da conjuntiva, pálpebras, lágrimas, ou mesmo da superfície interna das próteses e da cavidade anoftálmica, sendo que as espécies mais frequentes são *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (2,3). Esses microrganismos estão diretamente relacionados a casos de ceratite bacteriana, conjuntivites, endoftalmites (4,5), blefarite crônica, queratite (6), entre outros, além de terem a capacidade de se aderir e proliferar em uma grande variedade de superfícies, incluindo superfícies acrílicas. Dessa forma, a prótese ocular pode se tornar um reservatório para esses patógenos (7). Atualmente, existe um grande número de relatos a respeito do impacto das propriedades físicas dos materiais na adesão bacteriana e uma relação particularmente forte e positiva entre a adesão bacteriana e rugosidade de superfície tem sido destacada (8-15). Considera-se que a rugosidade do material é uma propriedade relevante para o processo de adesão bacteriana , já que as irregularidades da superfície polimérica podem promover um aumento da área de superfície e depressões que fornecem sítios mais favoráveis para colonização, tais como fendas ou fissuras que protegem as células contra as forças de cisalhamento (8,16).

A rugosidade de superfície da resina acrílica utilizada na confecção das próteses oculares pode ser alterada por diversos fatores, tais como exposição a variações de

temperatura, degradação pelo tempo de uso, alterações causadas por soluções e métodos de limpeza, quedas (17), porosidades associadas a falhas na confecção (18), polimento final (19), entre outros fatores (20,21).

Uma vez que o comportamento de adesão microbiana em polímeros depende supostamente da rugosidade de superfície do material, e que esta pode ser alterada por inúmeros fatores, verifica-se a importância de avaliar a interferência da rugosidade de superfície de resinas acrílicas para prótese ocular na adesão microbiana sobre essa superfície.

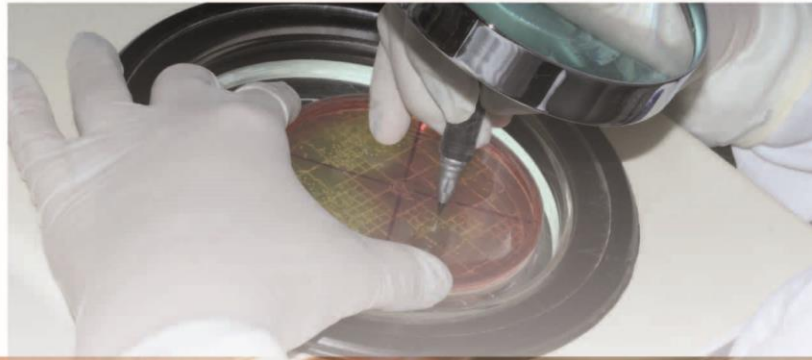


2.4 PROPOSIÇÃO

2.4 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos simular diferentes rugosidades de superfície de uma resina acrílica utilizada na confecção de esclera artificial para prótese ocular a fim de avaliar a interferência da rugosidade na formação de biofilme de duas espécies bacterianas recorrentes na cavidade anoftálmica: *S.aureus* e *S. epidermidis*.

A hipótese desse estudo foi de que a formação de biofilme dos microrganismos seria influenciada pela rugosidade da resina acrílica.



2.5 MATERIAIS E MÉTODOS



2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

- ***Confecção dos corpos de prova em resina acrílica***

Foram confeccionados 125 corpos prova de resina acrílica, os quais foram divididos em 5 grupos, (n=24 para análise de rugosidade, e n=1 para análise de microscopia de força atômica, para cada grupo), de acordo com o polimento utilizado (lixa de granulação 120, 400, 800, 1200 e disco de feltro associado à solução de sílica coloidal).

Para a confecção dos corpos de prova em resina acrílica, foi utilizada uma matriz metálica vazada contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Esta matriz foi aderida a uma lâmina de vidro retangular. Em seguida o conjunto lâmina de vidro + matriz metálica foi incluído em mufla própria para polimerização em forno micro-ondas (VIPI STG, VIPI Indústria, Pirassununga, São Paulo, Brasil), sendo preenchido com gesso especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind e Com Ltd, Rio de Janeiro, Brasil). Após a cristalização do gesso, outra lâmina de vidro foi posicionada sobre a matriz já incluída. A contra-mufla foi posicionada e sobre a superfície desta última lamina de vidro foi vertido gesso especial tipo IV. Após a cristalização, a mufla foi aberta, a resina acrílica termopolimerizável N1 (cor branca) para esclera artificial (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil) foi proporcionada, manipulada e inserida no interior das superfícies da matriz. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada a prensa hidráulica (VH, Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) com força de 1200 Kg/F, durante 2 min (minutos), e realizada a polimerização de bancada por 30 min e por energia de micro-ondas durante 10 min. Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta e os corpos de prova removidos (21,22). Em seguida, a fim de obter diferentes rugosidades superfície, os corpos de prova foram submetidos ao polimento durante 3 min, utilizando-se lixas metalográficas (Buehler, Illinois, EUA) de diferentes granulações, sendo estas, em ordem crescente de refinamento, as seguintes: 120, 400, 800 e 1200. Além disso, em

um dos grupos foi realizado polimento com lixa de granulação 1200 e disco de feltro associado ao uso de uma solução diamantada a base de sílica coloidal (Buehler, Illinois, EUA) de cor azul, granulometria de 1 micra. Após os polimentos, foi realizada limpeza em ultrassom (Arotec, Odontobrás, São Paulo, Brasil) por 20 min em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina, e após isso os corpos de prova foram deixados ao ar livre para secagem.

- ***Análise da rugosidade de superfície***

A rugosidade de superfície (n=24 para cada grupo) foi determinada por meio de um perfilômetro (Dektak d-150; Veeco, Plainview, Nova Iorque, EUA). Um corpo de prova foi individualmente posicionado no centro do equipamento e a ponta medidora do perfilômetro incidiu na superfície do mesmo. Os valores de Ra (média aritmética da rugosidade de superfície) foram mensurados usando *cut off* de 500 μm , no tempo constante de 12 s (segundos). Três leituras foram realizadas sobre cada superfície e a média foi calculada. Os valores originais foram dados em Angström ($\text{\AA}$), e a partir de então transformados para a escala micrométrica (μm) (23).

Após o polimento superficial e análises de rugosidade, os corpos de prova foram esterilizados com óxido de etileno para as posteriores análises microbiológicas.

- ***Caracterização das Superfícies por MFA***

Um corpo de prova de cada grupo foi analisado pela MFA (AFM; Veeco Metrology Inc., Santa Barbara, CA, EUA). As imagens obtidas foram transportadas do microscópio para um computador. Em seguida, foram enviadas para o programa Nanoscope Analysis (2004 Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, CA, EUA), e submetidas aos filtros (“lowpass” e medium”). Todas as imagens em três dimensões (3D) foram padronizadas em escala de altura

mínima de -100 nm e máxima de 100 nm (eixo z) para posterior comparação qualitativa entre os grupos (23).

- ***Inoculação e condições de crescimento***

Os ensaios de biofilme foram realizados de acordo com Salles et al. (2015), com algumas modificações (24).

Para a análise microbiológica, foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. As células foram mantidas em -70°C em solução contendo meio caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco Kansas City, MO, USA) e 20% de glicerol e em seguida, semeadas em placas contendo meio de cultura Manitol Salt Agar (Difco, Kansas City, USA) e incubadas a 37°C em condições de aerobiose por 24 h.

Inicialmente, curvas de crescimento foram realizadas para cada microrganismo com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para que cada um deles atingisse sua fase de maior divisão celular (fase log ou exponencial), o que foi observado pelos valores de Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro (Eon Microplate; BioTek). As culturas foram então repicadas em meio caldo BHI e mantidas por 24h a 37°C em aerobiose. Uma nova cultura foi obtida no dia do experimento visando atingir o crescimento até a metade da fase logarítmica (fase mid-log – DO. 0.5) e padronização da concentração celular de 10^7 UFC/mL.

- ***Ensaio de Adesão e Contagem dos Microrganismos***

Os corpos de prova foram distribuídos para realização das análises microbiológicas realizadas com os 2 microrganismos propostos (*S. aureus* e *S. epidermidis*), por 2 períodos de incubação: 4 e 24 horas. Para cada microrganismo e período de incubação, foram

realizados 2 ensaios em dias independentes, sendo que em cada ensaio, 3 corpos de prova de cada grupo de polimento foram utilizados.

Após o crescimento até a D.O. 0.5 e obtenção de 10^7 UFC/mL, alíquotas de 1 mL das culturas de *S. aureus* ou de *S. epidermidis* foram colocadas, separadamente, em contato com os corpos de prova de resina acrílica posicionados dentro de placas de microtitulação de 24 poços. Suspensões bacterianas foram incubadas em poços sem o corpo de prova para controle positivo. O controle negativo deste estudo foi o meio BHI sem adição dos microrganismos. As placas foram incubadas por 4 (fase de adesão microbiana) e 24 h (fase de formação do biofilme) a 37° C, em estufa de aerobiose. Após esse período, as células não aderidas foram removidas dos corpos de prova por meio de lavagem com 1mL de solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida, cada corpo de prova foi inserido em tubos de ensaio contendo 1mL de solução salina, os quais foram levados para banho ultrassônico (USC 700; UNIQUE Ultrasonic Cleaner, São Paulo, SP, Brasil) a 50 kHz, 150 W, durante 20min, seguida pela agitação (Vórtex Biomixer QL – 901, Curitiba, PR, Brasil) por 1min para promover o desprendimento das células aderidas (3, 25). Foram, então, realizadas 7 diluições seriadas, transferindo-se 10 µl dessa solução para 90 µl de solução salina. As diluições foram plaqueadas em meio Manitol Salt Agar, e incubadas por 24 horas à 37°C em estufa de aerobiose. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das UFCs/mL.

- **Análise dos dados**

Os valores da rugosidade de superfície e a contagem de microrganismos dos corpos de prova, para cada grupo e microrganismo foram submetidos ao teste de aderência à curva normal, a fim de se determinar se os mesmos provinham ou não de uma distribuição normal. Os dados de UFC/mL foram convertidos em escala logarítmica (Log UFC/mL). Foi constatada a distribuição normal para os valores de rugosidade de modo que os testes

estatísticos paramétricos de ANOVA e Tukey foram aplicados para comparar as médias dos dados ($p < 0,05$). Para os dados não paramétricos de contagem microbiana foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando $p < 0.05$.



2.6 RESULTADOS



2.6 RESULTADOS

Por meio da Análise de Variância ANOVA um fator e teste Tukey, podemos observar que houve diferença estatística significativa comparando-se os valores de rugosidade Ra obtidos pelos diferentes polimento, sendo que, os grupos 120 e 400 diferiram estatisticamente entre si, e em relação a todos os outros grupos, apresentando o grupo 120 o maior valor de rugosidade Ra, seguido pelo grupo 400 (Tabela 1). Os menores valores de rugosidade foram encontrados nos grupos 800, 1200 e 1200S (Tabela 1), o que coincide com as imagens obtidas na MFA (Figura 1).

Tabela 1. Valores médios (desvio padrão) de Rugosidade Ra (μm) da resina acrílica, de acordo com a lixa de polimento utilizada.

Resina Acrílica	
Rugosidade Ra (μm)	
120	1.72 (0.36) A
400	0.52 (0.12) B
800	0.03 (0.01) C
1200	0.02 (0.01) C
1200S	0.03 (0.01) C

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey

A Figura 1 mostra as imagens obtidas por meio da MFA, de um corpo de prova de cada grupo. A análise qualitativa referente à lisura superficial das imagens 3D do estudo mostra diferenças aparentes na imagem quanto à formação de irregularidades ao longo das extensões avaliadas. Assim, os grupos 120 e 400 (Figura 1.A e 1.B) apresentam as imagens que evidenciaram irregularidades com fendas e orifícios mais expressivos, ou mesmo o interior de uma fenda, ou seja, a formação de um “vale” mais profundo, no entanto sem a

definição do ponto mais superior dos “picos”, comparando-se àquelas que mantiverem ainda a característica de superfície polida (Figura1.E).

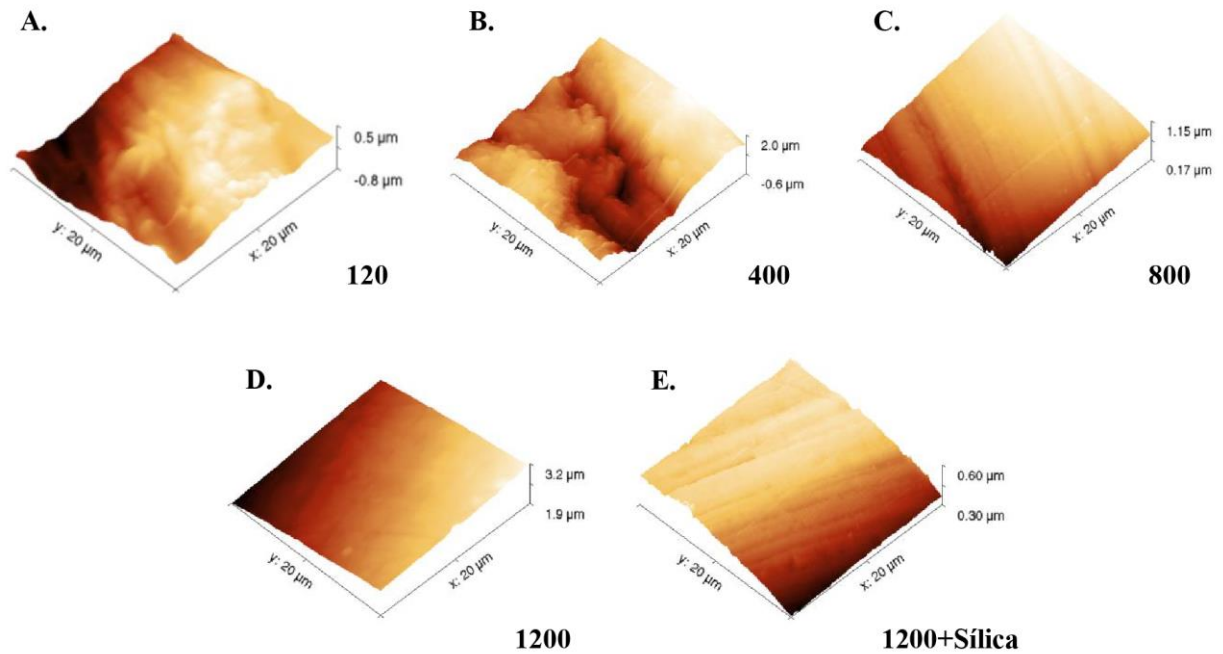


Figura 1: Imagens representativas da MFA: **A)** grupo polido com lixa de granulação 120; **B)** grupo polido com lixa de granulação 400; **C)** o grupo polido com lixa de granulação 800; **D)** grupo polido com lixa de granulação 1200; **E)** grupo polido com lixa de granulação 1200S e disco de feltro associado à solução de sílica (1200S).

A Figura 2 mostra os resultados da contagem do número de UFC/mL para *S. aureus*. Pode-se observar que o grupo 1200S apresentou os menores valores de crescimento bacteriano, com diferença significativa em relação ao controle, para ambos os tempos de avaliação.

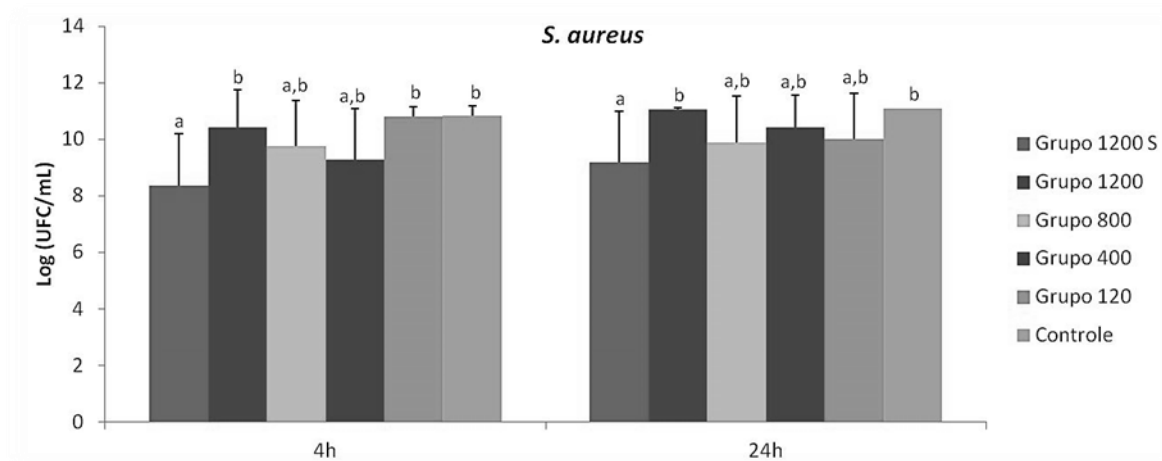


Figura 2. Média e desvio padrão da contagem das UFC/mL (em escala logarítmica) de *S. aureus* para cada grupo, após 4 e 24h de crescimento. *Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada período separadamente, de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

A Figura 3 mostra os resultados da contagem do número de UFC/mL para *S. epidermidis*. Pode-se observar que em 4h (fase de adesão) não houve diferença entre os grupos, porém, todos apresentaram contagem microbiana estatisticamente diferente em relação ao controle. No período de 24h, o grupo 1200S apresentou os menores valores de crescimento bacteriano, com diferença significativa em relação ao controle.

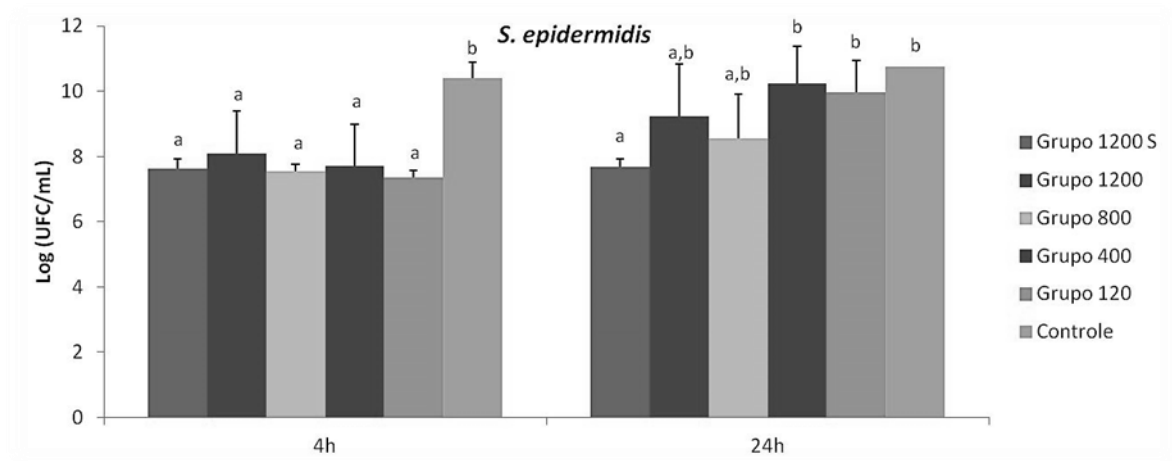


Figura 3. Média (DP) da contagem das UFC/mL (em escala logarítmica) de *S. epidermidis* para cada grupo, após 4 e 24h de crescimento. *Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada microrganismo separadamente, de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.



2.7 DISCUSSÃO



2.7 DISCUSSÃO

A hipótese deste estudo de que a formação do biofilme dos microrganismos não seria influenciada pela rugosidade da resina acrílica foi aceita, uma vez que as diferentes rugosidades não interferiram na formação dos biofilmes sobre a resina acrílica.

A adesão inicial de microrganismos às superfícies dos materiais é a chave principal para a colonização dos mesmos (16,26). Quando uma bactéria se adere e prolifera na superfície de um material, elas produzem substâncias poliméricas extracelulares e formam o biofilme, o qual as recobre e protege contra o sistema imune e agentes antimicrobianos (15). Durante o processo de adesão, a bactéria se adere firmemente à superfície do material através de interações físico-químicas, que compreendem a hidrofobicidade e carga da superfície celular, bem como a composição química e a rugosidade de superfície do material (16,27).

Diversos relatos anteriores mostraram que a adesão bacteriana *in vivo* é primeiramente determinada por uma rugosidade de superfície Ra maior que 0,2 μm (15, 28-31). Observamos em nosso estudo que, de modo geral, até mesmo os grupos com menores valores médios de Ra (0,02 e 0,03 μm) apresentaram crescimento bacteriano (Tabela 2, Figura 1). Esses dados corroboram com o estudo de Yoda et al. 2014 (15), que avaliaram a adesão de microrganismos em superfícies de diferentes biomateriais e obtiveram como resultado que mesmo as superfícies com níveis de rugosidade abaixo de 30 nm (0,03 μm) podem promover adesão bacteriana. Ainda, Lee et al. em 2011 (32), também observaram crescimento bacteriano em superfícies de resina composta, titânio e zircônia, todas com rugosidades abaixo de 0,2 μm (Ra= 0,179; 0,059 e 0,064 μm respectivamente).

Essas afirmações indicam que não há um consenso a respeito do nível mínimo de rugosidade para adesão microbiana e que esta pode diferir de acordo com o material utilizado e com a capacidade do microrganismo de se aderir às diferentes superfícies. Assim, observa-

se que a adesão bacteriana é um fenômeno multifatorial, e que a rugosidade de superfície não é a única característica que interfere nesse processo (15). Dessa forma, outros fatores também estão ligados ao potencial de adesão microbiana à superfície da resina acrílica, tais como sua hidrofobicidade, interações eletrostáticas, energia de superfície (33), a própria composição química do material, e a capacidade de adesão, tamanho e modo de divisão do microrganismo.

Foi relatado que os microrganismos tendem a se aderir em superfícies mais rugosas, com riscos e ranhuras (16). Entretanto, no nosso estudo observamos que, com exceção do grupo 1200 S, que recebeu polimento com lixa de granulação 1200 e disco de feltro associado à solução diamantada a base de sílica, os outros grupos não diferiram do controle, e no geral, também não diferiram entre si quanto aos valores de crescimento bacteriano (Figuras 2 e 3). Esses dados corroboram com o estudo de Taha et al. 2015 (29), que avaliaram a adesão de microrganismos, entre eles *S.aureus* e *Candida albicans*, em 3 tipos de fios ortodônticos com diferentes rugosidades, e não encontraram diferença significativa entre os grupos.

Ainda em concordância com nossos resultados, alguns autores relatam que nem sempre é observada uma relação linear entre a adesão bacteriana e a rugosidade de superfície (34-37). Um pequeno aumento na rugosidade pode levar a um aumento significativo na adesão de bactérias, enquanto que um grande aumento da rugosidade pode não ter efeito significativo na adesão (16). Estudos prévios (30,31) relataram que pequenas variações na rugosidade de superfície não apresentam efeito significativo na adesão bacteriana, o que poderia justificar a ausência de uma relação significativa entre a adesão microbiana e a rugosidade observada no nosso estudo (29). De acordo com uma revisão realizada por Rashid et al, embora superfícies polidas tenham demonstrado a presença de depressões e microtrincas, esses defeitos superficiais parecem não influenciar na rugosidade média Ra ou na adesão microbiana sobre essas superfícies (38).

Embora possamos observar nas imagens de MFA e nos valores de rugosidade Ra, que não houve diferença significativa entre os grupos 800, 1200 e 1200S. (Tabela 2, Figura 1.C-1.E), observamos que, considerando-se o desenvolvimento do biofilme, o grupo com polimento mais refinado (1200 S) foi, no geral, estatisticamente diferente do controle para as bactérias avaliadas, apresentando os menores valores de crescimento bacteriano (Figuras 2 e 3). Este resultado pode ter ocorrido em razão da implantação do íon Silício (Si), presente na solução diamantada utilizada no polimento desse grupo, o que tornou a superfície menos atrativa afetando o processo de adesão. O resultado obtido está de acordo com o estudo de Zhao et al. 2008 (39), o qual avaliou a interferência da incorporação de diferentes íons (N^+ , O^+ e SiF_3^+) na superfície de dispositivos de aço inoxidável utilizados na área de saúde, e observaram que na presença de SiF_3^+ houve uma redução significativa na adesão dos microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*, em relação aos outros íons avaliados e em relação ao grupo livre de incorporação de íons. De acordo com Zhao et al. (39), a incorporação de íons em um material pode reduzir sua energia de superfície, aumentar o ângulo de contato e diminuir a rugosidade de superfície, influenciando na molhabilidade e dificultando a adesão dos microrganismos. Além disso, Rashid et al. 2014 (38) relatam que o uso de solução diamantada para polimento pode prevenir o acúmulo de microrganismos na superfície dos materiais.

Embora nossos resultados sugiram uma fraca relação entre a rugosidade de superfície e a formação de biofilme, sabe-se que esta não é influenciada apenas por essa propriedade isolada. Dessa forma, não se deve negligenciar as etapas de polimento durante a confecção das próteses oculares, e nem mesmo os efeitos do envelhecimento, do mau uso, ou da interferência de soluções de limpeza sobre essa propriedade. Outros fatores também estão associados a rugosidade, como o conforto e estética satisfatória ao paciente (20,21)

Diversas limitações devem ser consideradas ao interpretar os resultados. O modelo de crescimento bacteriano utilizado neste estudo simulou *in vitro* as condições do crescimento estático do biofilme que se encontram na superfície de contato de uma prótese ocular com o tecido da membrana conjuntiva. A patogenicidade de dispositivos protéticos é um processo complexo envolvendo interações entre o patógeno, o material e o hospedeiro. Um estudo *in vitro* não pode contar com a defesa do hospedeiro e outros fatores como, por exemplo, temperatura, condições de fluxo e nutrição (15).

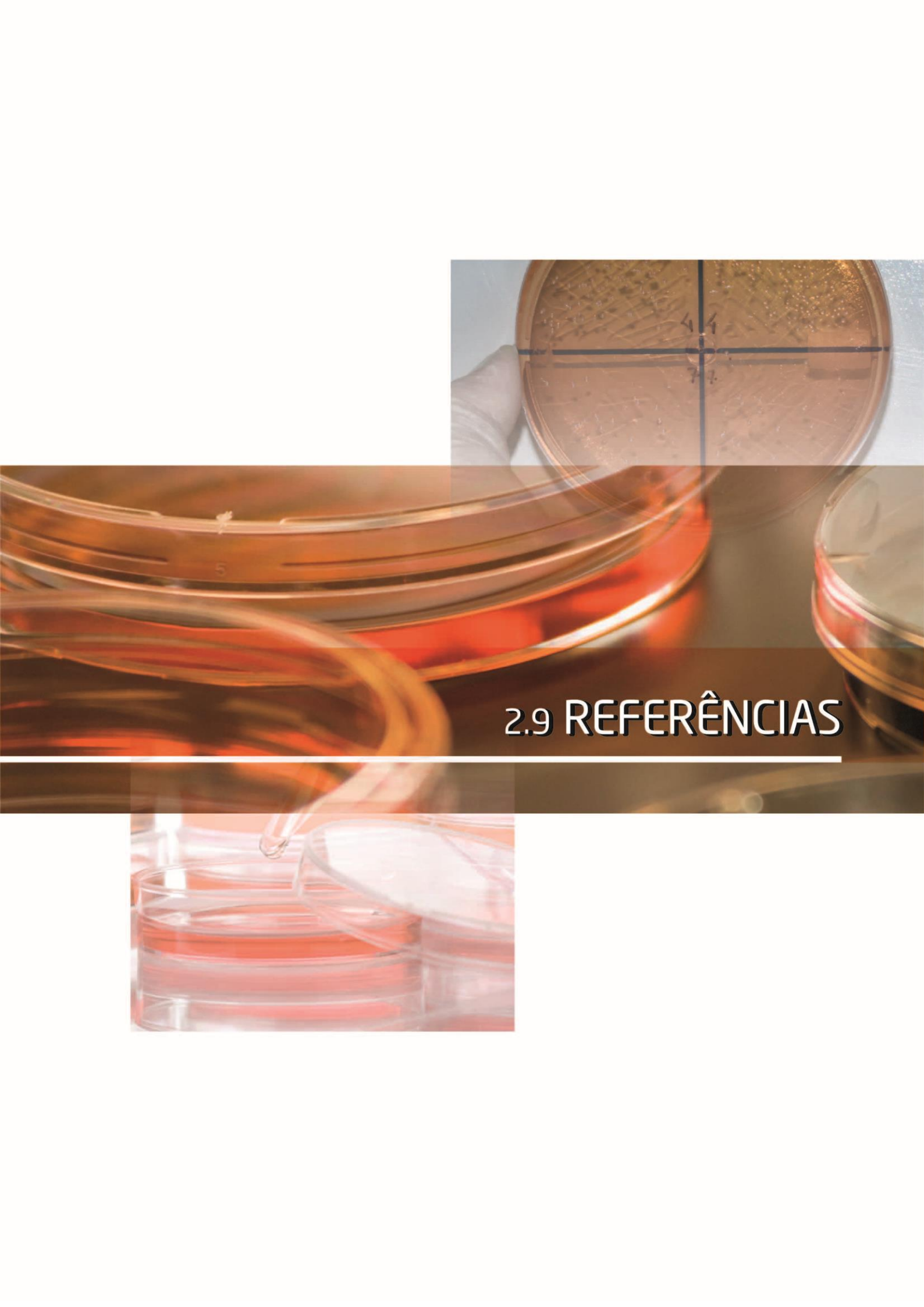


2.8 CONCLUSÃO



2.8 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os valores de rugosidade obtidos através dos diferentes polimentos não interferiram significativamente na formação de biofilme das bactérias avaliadas



2.9 REFERÊNCIAS

2.9 REFERÊNCIAS

1. Dayal Y, Rao SS, Mahajan VM. Comparative study of bacterial and fungal floras of contracted sockets and fellow eyes. *Ann Ophthalmol*, 1984 Feb;16(2):154, 156, 158 passim.
2. Willcox MD. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2013 Dec;117:99-105. doi: 10.1016/j.exer.2013.06.003. Epub 2013 Jun 22.
3. Paranhos RM, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci*, 2007; Feb;15(1):33-8.
4. Gaal V, Kilar F, Acs B, Szijjarto Z, Kocsis B, Kustos I. In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;45(3-4):125-130.
5. Uesugui E, Cypel-Gomes MC, Atique D, Goulart DG, Gallucci FR, Nishiwaki-Dantas MC, et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais frequentes e sua suscetibilidade in vitro aos agentes antimicrobianos. *Arq Bras Oftal*. 2002;65(3):339-342.
6. Brothers KM, Nau AC, Romanowski EG, Shanks RM. Dexamethasone Diffusion Across Contact Lenses Is Inhibited by Staphylococcus epidermidis Biofilms in Vitro. *Cornea*. 2014;33(10):1083-1087.
7. Altieri KT, Sanita PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, et al. Eradication of a mature methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J*. 2013;24(5):487-491.
8. Katsikogianni M1, Missirlis YF.. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 2004; Dec 7;8:37-57.
9. Busscher HJ, van der Mei HC.. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*, 1997; Apr;11(1):24-32.

10. Gottenbos B1, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Grijpma DW, Feijen J. Initial adhesion and surface growth of *Pseudomonas aeruginosa* on negatively and positively charged poly(methacrylates). *J Mater Sci Mater Med*, 1999; Dec;10(12):853-5.
11. Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA. Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *J Colloid Interface Sci*, 1998; Dec 1;208(1):23-33.
12. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M.. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 2006; Oct;17 Suppl 2:68-81.
13. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009; Jul-Aug;24(4):616-26.
14. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*, 1993; Sep;72(9):1304-9.
15. Yoda I, Koseki H1, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, et al. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol*, 2014; Sep 2;14:234.
16. Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone. *Int J Biomater*, 2009;2009:718017. doi: 10.1155/2009/718017. Epub 2009 Jan 25.
17. Raizada K, Rani D. Ocular prosthesis. *Cont Lens Anterior Eye* 2007; 30: 152–162.
18. Canadas MD, Garcia LF, Consani S et al. Color stability, surface roughness, and surface porosity of acrylic resins for eye sclera polymerized by different heat sources. *J Prosthodont* 2010; 19: 52–57.
19. Braun KO, Mello JA, Rached RN et al. Surface texture and some properties of acrylic resins submitted to chemical polishing. *J Oral Rehabil* 2003; 30: 91–98.

20. Moreno A1, Goiato MC, dos Santos DM, et al. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology*. 2013 Mar;30(1):32-9.
21. Santos DM1, Nagay BE, da Silva EV, et al. In vitro analysis of different properties of acrylic resins for ocular prosthesis submitted to accelerated aging with or without photopolymerized glaze. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Dec 1;69:995-1003.
22. Monteiro DR, Gorup LF, OTakamiya AS et al Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles, *J. Prosthodont*. 21 (2012) 7–15.
23. Faverani LP, Barão VA, Ramalho-Ferreira G, et al. Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Jan;102(1):22-30. doi: 10.1002/jbm.b.32949. Epub 2013 May 10.
24. Salles MM, Oliveira Vde C, Souza RF, et al. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning - in vitro evaluation. *Braz Oral Res*. 2015;29:1-6. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0104. Epub 2015 Aug 21.
25. Tan H, Peng Z, Li Q, et al. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials*. 2012 Jan;33 (2):365-77. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.084. Epub 2011 Oct 20.
26. Loney RW, Moulding MB, Hacker CH, Ritsco RG. Finishing and polishing of a poly (fluoroalkoxyphosphazene) resilient denture liner. *Int J Prosthodont*, 1994; Jul-Aug;7 (4):362-7.
27. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*, 1998; Fall;43(3):338-48.

28. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*, 1997; Jul;13(4):258-69.
29. Taha M, El-Fallal A, Degla H. In vitro and in vivo biofilm adhesion to esthetic coated arch wires and its correlation with surface roughness. *Angle Orthod*, 2016; Mar;86(2):285-91. Epub 2015 Jun 25.
30. Bollen CM, Papaioanno W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res*, 1996; Sep;7(3):201-11.
31. Quirynen M1, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*, 1995; Jan;22(1):1-14.
32. Lee BC, Jung GY, Kim DJ, Han JS. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont*, 2011; Jun;3(2):81-4. Epub 2011 Jun 30.
33. Zamperini CA, Carneiro Hde L, Rangel EC, Cruz NC, Vergani CE, Machado AL. In vitro adhesion of *Candida glabrata* to denture base acrylic resin modified by glow-discharge plasma treatment. *Mycoses*, 2013; Mar;56(2):134-44. Epub 2012 Jul 19.
34. Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ. The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Jan;9(1):17-22.
35. Lee HJ, Park HS, Kim KH, Kwon TY, Hong SH. Effect of garlic on bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Angle Orthod*, 2011; Sep;81(5):895-900. Epub 2011 Mar 28.
36. Lee HJ, Park HS, Kim KH, Kwon TY, Hong SH. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. *Angle Orthod*, 2011; Sep;81(5):895-900. Epub 2011 Mar 28.

37. Kim IH, Park HS, Kim YK, Kim KH, Kwon TY. Comparative short-term in vitro analysis of mutans streptococci adhesion on esthetic, nickel-titanium, and stainless-steel arch wires. *Angle Orthod*, 2014; Jul;84(4):680-6. Epub 2013 Dec 5.
38. Rashid, H. The effect of surface roughness on ceramics used in dentistry: A review of literature. *Eur J Dent*, 2014; Oct;8(4):571-9. doi: 10.4103/1305-7456.143646.
39. Zhao Q1, Liu Y, Wang C, Wang S, Peng N, Jeynes C. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. *Med Eng Phys*, 2008; Apr;30 (3):341-9. Epub 2007 Jun 4.



3. CAPÍTULO 2

*O artigo referente ao Capítulo 2 será formatado de acordo com as normas do periódico Biofouling, contidas no ANEXO 4.3

EFEITO DE DIFERENTES AGENTES ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILME EM RESINA ACRÍLICA PARA PRÓTESE OCULAR E NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DA CONJUNTIVA HUMANA

3.1 RESUMO

O controle da formação de biofilme é essencial para manter a saúde da cavidade anoftálmica dos portadores de prótese ocular. Contudo, é necessário que a técnica de limpeza e desinfecção realizada seja eficaz e não cause irritação tecidual na conjuntiva ocular. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia antimicrobiana e a citotoxicidade de diferentes agentes antimicrobianos em próteses oculares. Para isso, foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica para prótese ocular, sobre as quais foram desenvolvidos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*. O efeito sobre o biofilme formado foi avaliado após tratamento com: soro fisiológico, sabão neutro, clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent®, triclosan 1% e citronela. O biofilme foi avaliado por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. A citotoxicidade dos agentes antimicrobianos foi avaliada por meio dos testes de MTT e Neutral Red. Para esses ensaios, 108 corpos de prova foram tratados diariamente por 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias com as soluções já citadas (n=3 para cada tratamento, para cada período), sendo avaliados ao fim de cada período. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de ANOVA, Tukey-Kramer HSD ($p \leq 0.01$) e Bonferroni ($p \leq 0.05$). Os resultados demonstraram que, comparados ao grupo controle (crescimento sem a presença do antimicrobiano), todos os protocolos de limpeza promoveram redução no crescimento dos microrganismos, sendo que os grupos expostos aos tratamentos com clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent® e triclosan 1% eliminaram o biofilme. Ainda, todos os extratos dos agentes antimicrobianos permitiram a proliferação das células da conjuntiva acima de 84% nos ensaios de citotoxicidade. Dessa forma, conclui-se que os protocolos de limpeza de imersão em clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent® e

triclosan 1% são eficazes na desinfecção e não apresentam citotoxicidade para as células da conjuntiva humana, sendo assim, poderiam ser os mais indicados para uso em próteses oculares.

Palavras-chave: Olho Artificial; Resinas Acrílicas; Biofilmes; Desinfecção; Toxicidade.

EFFECT OF DIFFERENT ANTIMICROBIAL AGENTS ON THE BIOFILM FORMATION IN ACRYLIC RESIN FOR OCULAR PROSTHESIS AND IN THE PROLIFERATION OF HUMAN CONJUNCTIVAL CELLS

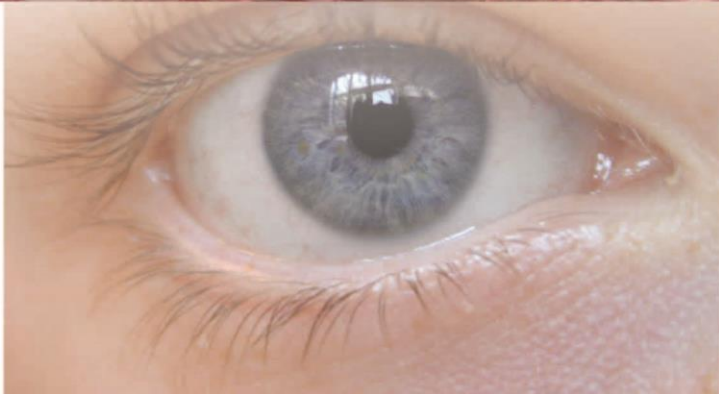
3.2 ABSTRACT

The control of biofilm formation is essential to maintain the health of the anophthalmic cavity of ocular prosthesis wearers. Therefore, it is necessary that cleaning and disinfection techniques performed are effective and do not cause conjunctival tissue irritation. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial efficacy and cytotoxicity of different cleansing solutions in ocular prostheses. For this, samples of acrylic resin used in ocular prosthesis were prepared, on which biofilms of *S. aureus* and *S. epidermidis* were developed. The biofilm was evaluated after cleansing with the solutions: saline, friction with neutral soap, 4% chlorhexidine, Efferdent® effervescent tablets, 1% triclosan and citronella. The biofilm was evaluated by counting CFU/mL. The cytotoxicity of the antimicrobial agents was evaluated through MTT and Neutral Red assays. For these tests, 108 samples were treated daily for 1, 7, 15, 30, 60 and 90 days with the previously mentioned solutions (n = 3 for each solution, for each period), and were evaluated at the end of each period. Data were submitted to ANOVA, Tukey-Kramer HSD ($p \leq 0.01$) and Bonferroni ($p \leq 0.05$) tests. The results showed that, in comparison to control group (microbial growth without the presence of antimicrobial), all cleansing protocols promoted a reduction in the growth of microorganisms, and the groups submitted to cleansing with 4% chlorhexidine, Efferdent® effervescent tablets and 1% triclosan eliminated the biofilm. In addition, all groups showed cell proliferation of conjunctival cells above 84% in the cytotoxicity assays. Thus, it was concluded that immersion cleansing protocols in 4% chlorhexidine, Efferdent® effervescent tablets and 1% triclosan could be the most indicated for cleaning ocular prosthesis, since they are effective in removing biofilm and do not present cytotoxic activity in conjunctive cells.

Key Words: Eye, Artificial; Acrylic Resins; Biofilms; Disinfection; Toxicity.



3.3 INTRODUÇÃO



3.3 INTRODUÇÃO

A prótese ocular é considerada um importante tratamento reabilitador para pacientes acometidos pela perda total ou parcial do globo ocular devido a trauma, neoplasias ou deformações congênitas(1). Entretanto, os usuários de prótese ocular são susceptíveis a infecções, inflamações e traumas relacionados a modificações fisiológicas e morfológicas da cavidade anoftálmica; mobilidade prejudicada devido instalação inadequada da prótese; higienização da prótese negligenciada sem remover a prótese da cavidade por meses ou anos e sem lavá-la; acúmulo de secreção, que pode causar conjuntivite papilar e intolerância ao uso da prótese, levando à colonização da cavidade e da prótese ocular por microbiota patogênica(2). De acordo com Willcox et al. (2013)(3), os estafilococos são as bactérias mais comuns isoladas da conjuntiva, pálpebras, lágrimas, ou mesmo da superfície interna das próteses e da cavidade anoftálmica, sendo as espécies mais frequentes o *S. aureus* e *S. epidermidis* (2, 3) Esses microrganismos estão diretamente relacionados a casos de ceratite bacteriana, conjuntivites, endoftalmites (4, 5), blefarite crônica, queratite (6), entre outros, além de terem a capacidade de se aderir e proliferar em uma grande variedade de superfícies, incluindo superfícies acrílicas. Dessa forma a prótese ocular pode se tornar um reservatório para esses patógenos(7).

O controle da formação de biofilme é muito importante para manter a saúde da cavidade anoftálmica dos portadores de prótese ocular e pode ser realizado por meio de técnicas de limpeza e desinfecção diárias com produtos facilmente encontrados no mercado, como, por exemplo, o sabão neutro (8-10). Dentre as soluções potencialmente antimicrobianas aplicadas na desinfecção de próteses oculares, destaca-se a clorexidina, um agente antimicrobiano de amplo espectro que tem sido muito utilizado na pele, mucosa e cavidade oral como desinfetante devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, impedindo a proliferação de microrganismos (2, 8, 9).

Alguns sabonetes antissépticos também podem ser usados na limpeza/desinfecção das próteses oculares, uma vez que a maioria deles apresenta em sua composição o triclosan, um importante agente antimicrobiano (11), o qual apresenta efetividade antimicrobiana em diferentes formulações comerciais e concentrações (12). O uso de pastilhas efervescentes como as utilizadas para desinfecção de próteses removíveis intra-orais também têm sido relatadas, demonstrando resultados satisfatórios (8, 9, 13, 14)

Uma alternativa inovadora a ser pesquisada, são os fitoterápicos, sendo de baixo custo e fácil utilização, como por exemplo, a citronela(15). De acordo com Bassolé et al, as espécies de *Cymbopogon*, nas quais se inclui a citronela, são comumente usadas na medicina para tratamento de muitas doenças (16). Os óleos essenciais dessas espécies são conhecidos pela sua atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, analgésica, antinociceptiva, neurológica e inseticida (16-20).

Embora a limpeza da prótese seja imprescindível, após o uso de desinfetantes, o paciente pode não enxaguar corretamente a prótese antes de colocá-la de volta na cavidade anoftálmica. Ainda, devido à possibilidade de porosidades e ranhuras na resina acrílica, a prótese ocular pode acumular substâncias em sua superfície (21), as quais podem vir a ser difundidas para a cavidade anoftálmica, possivelmente causando algum dano à mucosa da cavidade (22). A maioria dos produtos químicos em contato direto com a pele ou mucosa podem ser potencialmente irritantes. Esse fator irritante não está somente relacionado à sua natureza química, mas também a muitos outros fatores, como: concentração, veículo, temperatura e alterações no tecido (trauma mecânico, ulcerações, eczemas). Essas considerações são diretamente aplicadas aos agentes antissépticos, que geralmente apresentam propriedades irritantes aos tecidos (23).

O potencial tóxico dessas substâncias já foi testado em muitos tipos de células (15-18), porém, não há dados na literatura a respeito de sua toxicidade nas células da conjuntiva ocular

humana, sendo este um dos únicos tecidos que permanece após a ressecção cirúrgica do globo ocular. A conjuntiva é uma membrana mucosa transparente, fina e resistente, que cobre a parte posterior da pálpebra e se estende para região posterior. Além de ricamente vascularizada, a conjuntiva protege a cavidade de corpos estranhos e infecções. A linhagem de células Chang, da conjuntiva humana, tem sido amplamente utilizada em estudos *in vitro* que analisam potenciais efeitos, dentre eles a citotoxicidade de substâncias sobre a conjuntiva (19). Testes *in vitro* da citotoxicidade são importantes para avaliar a segurança e biocompatibilidade na utilização de substâncias em seres humanos. O método de cultura de células é um teste relativamente simples de ser executado, é reprodutível, pode ser cuidadosamente controlado e possui adequado custo-benefício (20, 21).



3.4 PROPOSIÇÃO



3.4 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia antimicrobiana e a citotoxicidade de diferentes soluções (sabão neutro, clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent®, triclosan 1% e citronela) sobre células da conjuntiva ocular humana. As hipóteses desse estudo são de que as soluções serão eficazes na remoção dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* formados na superfície da resina acrílica e que não produzirão efeitos tóxicos sobre a linhagem celular da conjuntiva humana.



3.5 MATERIAIS E MÉTODOS



3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

- ***Confecção dos corpos de prova em resina acrílica***

Para a confecção dos corpos de prova em resina acrílica, foi utilizada uma matriz metálica vazada contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Esta matriz foi aderida a uma lâmina de vidro retangular. Em seguida o conjunto lâmina de vidro + matriz metálica foi incluído em mufla própria para polimerização em forno micro-ondas (VIPI STG, VIPI Indústria, Pirassununga, São Paulo, Brasil), sendo preenchido com gesso especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind e Com Ltd, Rio de Janeiro, Brasil). Após a cristalização do gesso, outra lâmina de vidro foi posicionada sobre a matriz já incluída. A contra-mufla foi posicionada e sobre a superfície desta última lamina de vidro foi vertido gesso especial tipo IV. Após a cristalização, a mufla foi aberta, a resina acrílica termopolimerizável N1 (cor branca) para esclera artificial (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil) foi proporcionada, manipulada e inserida no interior dos compartimentos da matriz. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada a prensa hidráulica (VH, Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) com força de 1200 Kg/F, durante 2 min (minutos), e realizada a polimerização de bancada por 30 min e por energia de micro-ondas durante 10 min. Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta e os corpos de prova removidos (22, 23). Em seguida, as superfícies dos corpos de prova foram submetidas ao polimento durante 3 min, utilizando-se lixas metalográficas, em diferentes granulações (Buehler, Illinois, EUA) e solução sílica coloidal (Buehler, Illinois, EUA) de cor azul, granulometria de 1 micra. Após os polimentos, foi realizada limpeza em ultrassom (Arotec, Odontobrás, São Paulo, Brasil) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina, e após isso os corpos de prova foram deixados ao ar livre para secagem. Os corpos de prova que seriam submetidos aos ensaios microbiológicos foram esterilizados com óxido de etileno.

PARTE 1: ANÁLISE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME NA SUPERFÍCIE DOS CORPOS DE PROVA DE RESINA ACRÍLICA

- ***Inoculação e condições de crescimento dos microrganismos***

Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. . As células foram mantidas em -70°C em solução contendo meio caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco Kansas City, MO, USA) e 20% de glicerol e em seguida, semeadas em placas contendo meio de cultura Manitol Salt Agar (Difco, Kansas City, USA) e incubadas a 37°C em condições de aerobiose por 24 h.

Inicialmente, curvas de crescimento foram realizadas para cada microrganismo com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para que cada um deles atingisse sua fase de maior divisão celular (fase log ou exponencial), o que foi observado pelos valores de Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro. As culturas foram então repicadas em meio caldo BHI e mantidas por 24h a 37°C em aerobiose. Uma nova cultura foi obtida no dia do experimento visando atingir o crescimento até a metade da fase logarítmica (fase mid-log – DO. 0.5) e padronização da concentração celular de 10^7 UFC/mL.

- ***Desenvolvimento do biofilme***

Após o crescimento até a D.O. 0.5 e obtenção de 10^7 UFC/mL, alíquotas de 1 mL das culturas de *S. aureus* ou de *S. epidermidis* foram colocadas em contato com os corpos de prova de resina acrílica posicionados dentro de placas de microtitulação de 24 poços. Como controles do estudo, em cada placa de 24 poços foi incluído 1 poço com meio de cultura puro sem microrganismo e sem corpo de prova (para avaliar se houve contaminação do meio), 1 poço com corpo de prova sem desinfecção e sem microrganismo - controle negativo (para

avaliar contaminação dos corpos de prova), e 1 poço com corpos de prova sem desinfecção e com microrganismo - controle positivo (para avaliar o crescimento sem interferência do desinfetante). As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C, em estufa de aerobiose.

- ***Exposição dos corpos de prova aos tratamentos antimicrobianos propostos***

Após as 24 h, o meio de cultura presente em cada poço foi aspirado e os corpos de prova submetidos a cada um dos processos propostos a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Procedimentos realizados nos corpos de prova de resina acrílica

Soluções antimicrobianas	Tratamentos	Fabricante
Soro fisiológico	Imersão em 1 mL por 10 min.	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.
Sabão Neutro	Fricção digital por 30 segundos (8, 10, 24)	Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.
Clorexidina 4%	Imersão em 1 mL por 10 min (8, 9, 13, 25).	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.
Pastilhas Efervescentes - Efferdent Original Denture Cleanser	Imersão em água destilada estéril contendo uma pastilha efervescente, à temperatura de 37° C por 15 min. (9, 13)	Pfizer Consumer Health, Morris Plains, Nova Jersey, EUA.
Triclosan 1%	Imersão em 1 mL por 10 min.	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP
Óleo Essencial de Citronela	Imersão em 1 mL por 10 min.	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.

- **Contagem dos Microrganismos**

Após os tratamentos, as células não aderidas foram removidas dos corpos de prova por meio de lavagem com 1mL de solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida, cada corpo de prova foi inserido em tubos de ensaio contendo 1mL de solução salina, os quais foram levados para banho ultrassônico (USC 700; UNIQUE Ultrasonic Cleaner, São Paulo, SP, Brasil) a 50 kHz, 150 W, durante 20min, seguida pela agitação (Vórtex Biomixer QL – 901, Curitiba, PR, Brasil) por 1min para promover o desprendimento das células aderidas. Foram, então, realizadas 7 diluições seriadas, transferindo-se 10 µl dessa solução para 90 µl de solução salina. As diluições foram plaqueadas em meio Manitol Salt ágar, e incubadas por 24 horas à 37°C em estufa de aerobiose. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das UFCs/mL. Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois dias independentes.

PARTE 2: TESTE DE CITOTOXICIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os corpos de prova de resina acrílica para o teste de citotoxicidade foram submetidos aos mesmos processos já descritos na Tabela 1, por diferentes períodos de tempo: 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, sendo utilizados corpos de prova diferentes para cada período. O grupo imerso em soro fisiológico foi mantido na solução durante os períodos estipulados.

Para cada agente antimicrobiano, foram confeccionadas 3 corpos de prova para cada período de tratamento, totalizando 108 corpos de prova. Após cada período, a citotoxicidade das soluções propostas foi avaliada por meio das análises descritas a seguir.

- ***Obtenção dos Extratos***

Os extratos das substâncias hidrossolúveis presentes nas amostras previamente desinfetadas foram utilizados para a análise do seu efeito citotóxico (20, 26). Para isso, após

cada período de tratamento com as soluções propostas, seguindo os protocolos acima recomendados, cada grupo foi submetido ao respectivo processo de limpeza (n=3), foi colocado em um tubo de ensaio contendo 6 mL de meio de cultura 199 (Gibco, Nova Iorque, EUA), suplementado com uma concentração 5% de soro fetal bovino, previamente determinada por um estudo piloto, e incubado em estufa à 37°C pelo período de 24 h. No curso desse período de incubação ocorreu a difusão das substâncias para o meio de cultura, com a consequente formação dos extratos que foram utilizados no testes de citotoxicidade. Posteriormente, filtros Millex (Merck Millipore Corporation, Darmstádio, Alemanha) de 0,22 µm foram utilizados para filtrar os extratos, tendo em vista a grande facilidade de contaminação do meio devido a sua riqueza em nutrientes.

- ***Cultura e Manutenção das Células***

A linhagem de células epiteliais da conjuntiva humana (Wong Kilbourne derivada da conjuntiva Chang, clone 1-5c-4), obtida da American Type Culture Collection (CCL-20.2, Virgínia, EUA), foi utilizada. As células foram expandidas em meio de cultura 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5 mL de penicilina, 300 µL de fungizone e 500 µL de gentamicina. Essas células foram cultivadas em garrafas para culturas de células com tampa, que permitem a passagem de CO₂ por meio de um filtro. Por sua vez, as garrafas foram incubadas com 5% de CO₂, em ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C (27-30). Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novas garrafas até atingirem confluência para a realização dos ensaios. Após esse período, utilizou-se tripsina a 0,025%, incubada a 37°C por 2-5 min, com o objetivo de descolar e desagregar as células das garrafas e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1 mL foi depositado em nova garrafa, sendo acrescidos 9 mL de meio de cultura suplementado. As garrafas foram então tampadas e levadas à estufa para a formação de nova confluência de células.

Previamente aos procedimentos, todos os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados em luz ultravioleta, por 20 min, dentro da capela de fluxo laminar. Além disso, os procedimentos foram executados em área asséptica, dentro da capela de fluxo laminar já desinfetada com álcool 70 e luz ultra-violeta (26, 31).

- ***Quantificação das Células e Teste de Citotoxicidade***

Para a realização dos testes de citotoxicidade foram preparadas suspensões celulares de 1×10^5 células/mL da linhagem Chang, concentração previamente definida por um estudo piloto. Para isso, as células foram desgrudadas do fundo das garrafas. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 mL que foi levado à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, para permitir a precipitação das células no fundo do tubo. Em seguida, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de meio de cultura 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino, foi acrescentado e, por fim, as células foram misturadas a ele. A partir daí, 13 μ L foram retirados e colocados em câmara hemocitométrica tipo Neubauer. Então, com a utilização de um microscópio óptico, com aumento de 40 vezes, as células viáveis foram contadas. As suspensões celulares foram, posteriormente, ajustadas às concentrações de 1×10^5 células/mL para a linhagem Chang (28, 32, 33), sendo 1 mL pipetado em cada poço, de uma placa de 24 poços. Após o período de 24 h, foi realizado o descarte do meio de cultura e 500 μ L de cada extrato previamente obtido, com concentração de soro fetal bovino de 5%, foi adicionado em cada um dos poços. Após incubação das células e o período de contato com os extratos, a citotoxicidade dos agentes antimicrobianos foi avaliada por meio de duas análises de proliferação celular, que se complementam: MTT e Neutral Red.

O MTT é uma análise colorimétrica padrão para medir a atividade metabólica das células, por meio de enzimas que reduzem o MTT à formazan (sal azul) na mitocôndria,

conferindo à substância uma coloração arroxeada/azulada (34). Sendo assim, após 24 h de tratamento, os meios de cultura com os extratos foram retirados e substituídos por 0,5 mL de meio 199 sem a adição de soro fetal bovino, contendo 0,5 mg/mL de MTT (3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio), e incubados com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C por 2 horas (21, 35). Após a incubação, a presença de cristais de formazan foi checada nos 24 poços, com microscópio óptico. O meio de cultura foi aspirado e 500 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada poço. Posteriormente, foi realizada a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 570 nm por meio do espectrofotômetro UV-Visível (SpectraMax 190, Molecular Devices, Califórnia, EUA) (21, 35).

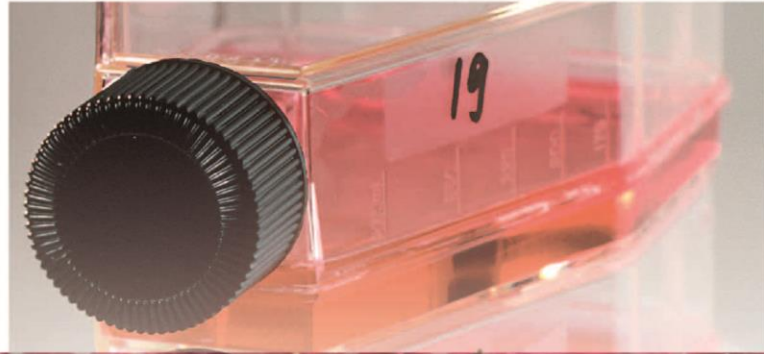
O teste com Neutral Red (NR) se baseia no fato de que apenas as células vivas são capazes de captar o corante NR e acumulá-lo em seus lisossomos. Esse teste pode determinar a quantidade de células vivas em uma cultura (36). Após 24 h de incubação e após aspirar os extratos, 0,5 mL do corante NR foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 2h a 37° C. Em seguida, NR e meio foram removidos dos poços e 500µL de ácido fórmico 1% foram adicionados a cada poço para lavagem. O ácido fórmico foi removido e 1 mL de ácido acético 1% foi adicionado a cada poço. Após extrair o corante das células, a viabilidade celular foi avaliada por densidade óptica da solução resultante a 540 nm utilizando espectrofotômetro UV-Visível.

Os poços controle para os testes MTT e Neutral Red consistiram em culturas de células não tratadas. Nos poços de controle negativo, 1 mL de meio de cultura 199 com 5% de soro fetal bovino foram adicionados, e nos poços de controle positivo, foram adicionados Tween 20 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluído em 1 mL de meio 199 com 5% de soro fetal bovino. Ambos foram submetidos às mesmas condições de incubação e temperatura utilizadas para a obtenção dos extratos.

As análises de citotoxicidade foram realizadas respeitando as normas da ISO-standard 10993-5 para análises de toxicidade in vitro (37). As taxas de sobrevivência dos controles representam 100% de proliferação. A viabilidade celular (%) foi calculada pela seguinte fórmula: $100 \times (\text{DO média grupo teste} / \text{DO média grupo controle})$ (26, 31).

- **Análise dos dados**

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade, no qual se constatou distribuição normal dos dados para a análise microbiológica e de citotoxicidade. Para os ensaios microbiológicos que apresentaram distribuição normal, as diferenças significantes foram verificadas pelo teste de ANOVA e Tukey. Enquanto que para os ensaios de citotoxicidade, o teste de ANOVA foi seguido pelo teste de Bonferroni. Todos considerando nível de significância de 5%.



3.6 RESULTADOS



3.6 RESULTADOS

Os resultados referentes à análise da eficácia antimicrobiana das soluções utilizadas mostraram que todos os processos de limpeza promoveram redução no crescimento dos microrganismos para ambos os microrganismos. Os grupos submetidos à imersão em Citronela mostraram os menores valores de eficácia antimicrobiana, seguido pelos grupos submetidos à fricção com sabão neutro, enquanto que os grupos tratados com clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent® e triclosan 1% apresentaram 100% de redução do biofilme, ou seja, eliminaram o biofilme formado na superfície da resina (Figura 1).

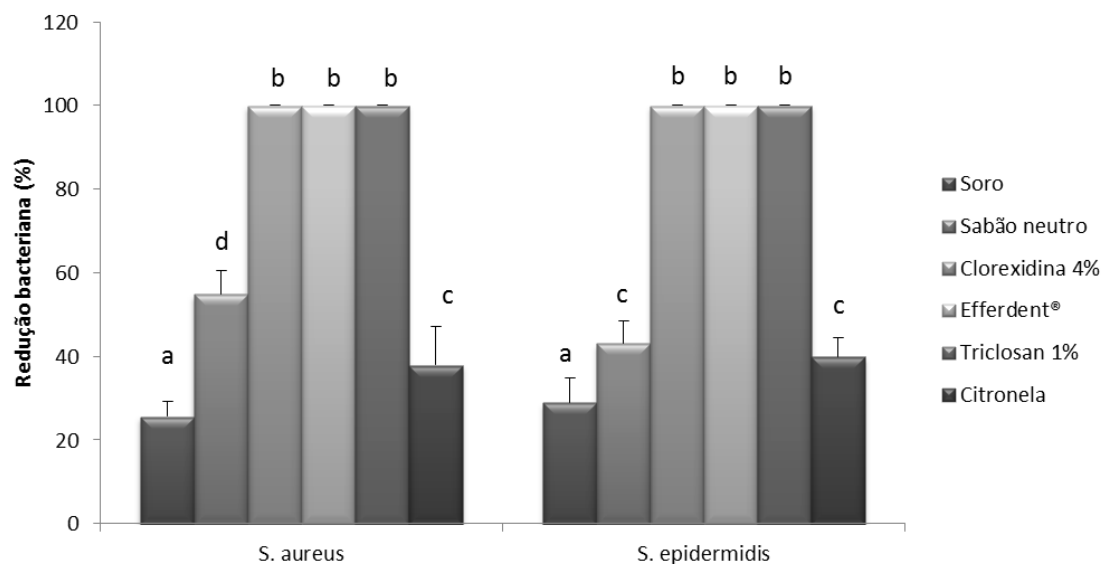


Figura 1. Médias e desvio-padrão das porcentagens de redução de *S. aureus* e *S. epidermidis* após tratamento com os agentes antimicrobianos. *Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, considerando cada microrganismo separadamente, de acordo com os testes de ANOVA/Tukey, $p < 0.01$

As Figuras 2 e 3 apresentam o percentual de proliferação celular após a exposição das culturas de células da conjuntiva aos extratos de resina acrílica previamente submetida aos tratamentos com os agentes antimicrobianos nos diferentes períodos, considerando-se os ensaios com MTT e Neutral Red respectivamente.

Em relação ao ensaio com MTT, os menores valores de proliferação celular foram encontrados para os grupos submetidos à fricção com sabão neutro, sendo esses estatisticamente menores em relação ao grupo não estimulado em 5 dos 6 períodos avaliados (1, 7, 15, 60 e 90 dias), com o menor valor sendo o de 84,35% para o período de 60 dias de tratamento (Figura 2). Por outro lado, os maiores valores de proliferação celular foram observados nos grupos imersos em citronela, sendo estes estatisticamente maiores em relação ao grupo não estimulado em 3 dos 6 períodos avaliados (30, 60 e 90 dias) (Figura 2). Além disso, embora observemos diferenças significantes nas comparações entre os períodos de tratamento dentro de um mesmo grupo, verificamos que não houve um padrão de aumento ou diminuição na proliferação celular, tanto no ensaio com MTT quanto com NR, para nenhum dos agentes antimicrobianos e períodos avaliados . Entretanto, observamos na análise com MTT que, para Citronela, os períodos de 15, 30, 60 e 90 dias apresentaram valores estatisticamente maiores em relação ao período de 1 dia, embora não de forma crescente, sendo o período de 30 dias o único maior e diferente estatisticamente em relação a todos os outros períodos (Figura 2).

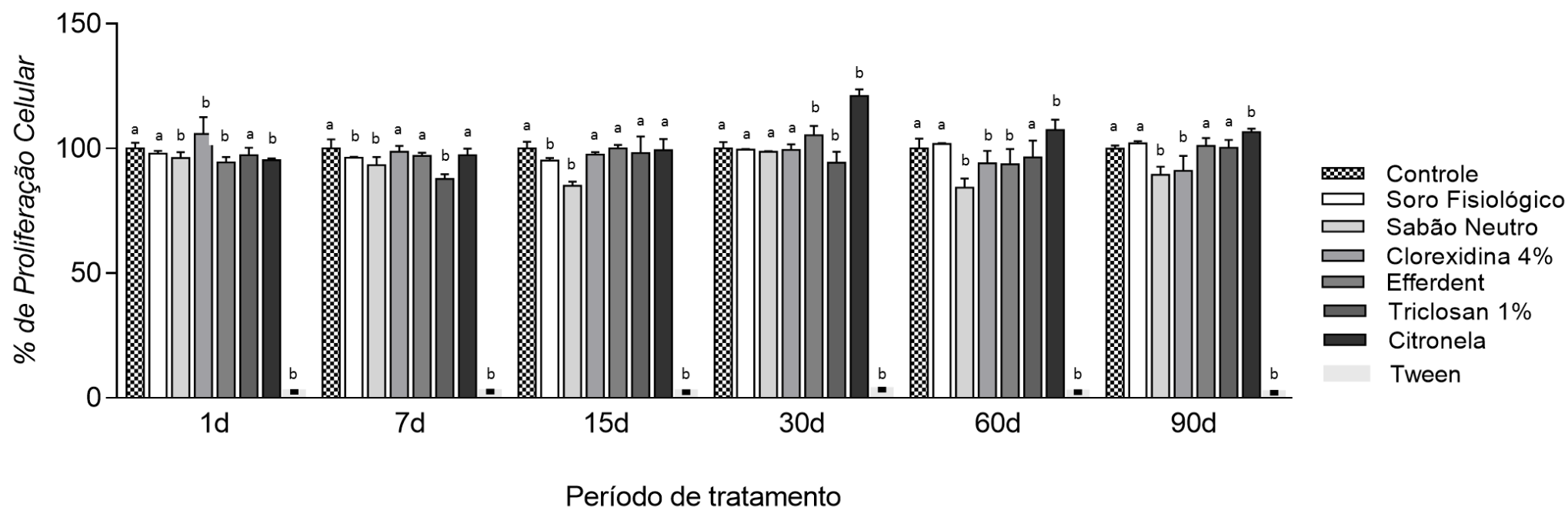


Figura 2: Média $\pm$ desvio padrão dos percentuais de proliferação celular obtidos pela análise com MTT, após a exposição das culturas de células da conjuntiva humana aos extratos de resina acrílica submetida aos tratamentos antimicrobianos por diferentes períodos. *Letras diferentes para cada período indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni, entre cada grupo de agente antimicrobiano e o respectivo controle negativo (grupo não estimulado).

Os valores de proliferação celular encontrados na análise com Neutral Red também demonstraram que, embora alguns grupos tenham apresentado diferença significativa em relação ao respectivo grupo não estimulado, nenhum dos agentes antimicrobianos avaliados apresentou potencial atividade citotóxica para com as células da conjuntiva ocular avaliadas, uma vez que nessa análise todos os agentes e períodos apresentaram valores de proliferação celular maiores que 90% (Figura 3). Ainda, a análise demonstrou que o maior valor de porcentagem de proliferação celular também foi encontrado no grupo imerso em solução a base de citronela (109,33% - 1 dia), sendo este o único grupo diferente estatisticamente em relação ao controle não tratado considerando o período de 1 dia de tratamento, e também considerando os outros períodos avaliados (Tabela 5, Figura 3), podendo, então, associar esse resultado aos maiores índices de proliferação celular encontrados para esse mesmo agente no ensaio com MTT (Figura 2).

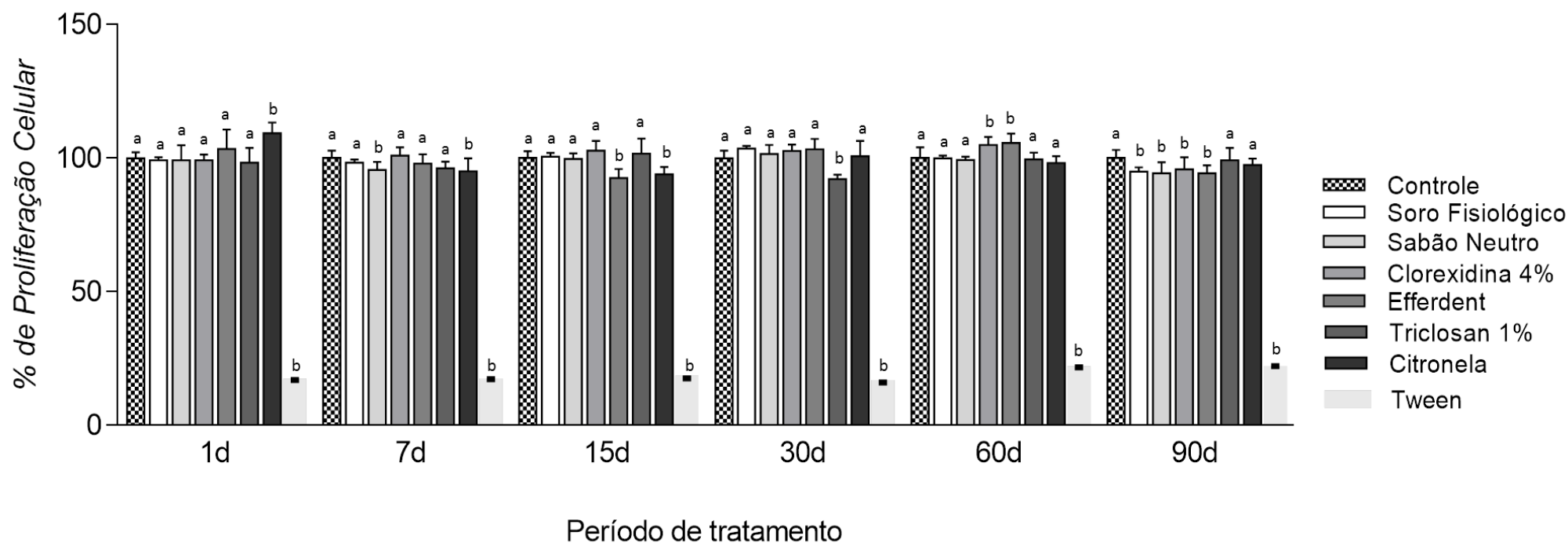
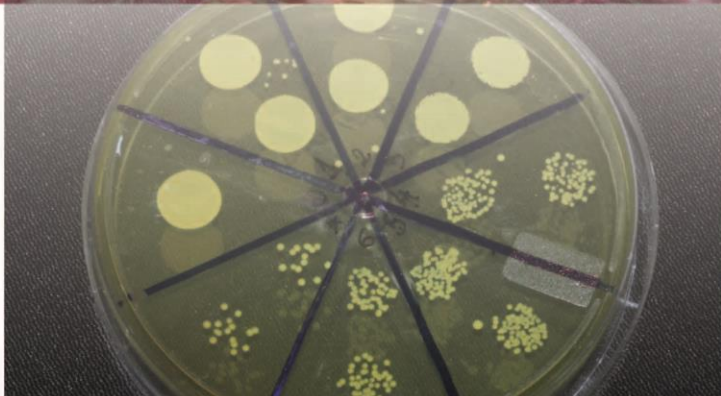


Figura 3: Média $\pm$ desvio padrão dos percentuais de proliferação celular obtidos pela análise com NEUTRAL RED, após a exposição das culturas de células da conjuntiva humana aos extratos de resina acrílica submetida aos tratamentos antimicrobianos por diferentes períodos. *Letras diferentes para cada período indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni, entre cada grupo de agente antimicrobiano e o respectivo controle negativo (grupo não estimulado).

Embora para ambos os ensaios a interação entre os fatores tenha sido significativa (Tabelas 2 e 3), e tenha havido diferenças estatisticamente significantes dos grupos tratados em relação aos respectivos controles dentro de um mesmo período, todos os valores de proliferação celular encontrados estão acima de 84%, demonstrando não haver atividade citotóxica dos agentes testados (Figuras 2 e 3).



3.7 DISCUSSÃO



3.7 DISCUSSÃO

As hipóteses testadas nesse estudo de que: 1- os tratamentos antimicrobianos seriam eficazes na remoção dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* desenvolvidos na resina acrílica, foi aceita, uma vez que todos promoveram redução no biofilme formado; 2 – os agentes antimicrobianos não produziram efeitos tóxicos sobre a linhagem celular da conjuntiva humana, foi aceita, pois nenhum apresentou atividade citotóxica nas células.

Em relação à capacidade antimicrobiana dos agentes testados, os resultados demonstraram que todos causaram diminuição do biofilme, sendo os tratamentos com clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent® e triclosan 1% extremamente eficazes, eliminando o biofilme formado sobre a superfície da resina ($p < 0,01$) (Figura 1). Considerando-se os ensaios de citotoxicidade celular, observou-se em nossos resultados que todos os valores de proliferação celular encontrados foram maiores que 84% . De acordo com a ISO-standard 10993-5, uma substância avaliada *in vitro* pode ser classificada como não-citotóxica (proliferação celular maior que 75%), discreta citotoxicidade (proliferação entre 50 e 75%), moderada citotoxicidade (entre 25 e 50%) e alta citotoxicidade (menor que 25%) (37). Sendo assim, os agentes antimicrobianos avaliados no nosso estudo não demonstraram atividade citotóxica para com as células da conjuntiva humana, independente do período de desinfecção realizado.

De acordo com Fardal & Turnbull (1986) (38), a clorexidina é ativa contra uma grande variedade de organismos gram-positivos e gram-negativos, fungos, aeróbios e anaeróbios facultativos. É conhecido que o gluconato de clorexidina é de rápida absorção pelas células bacterianas, o que resulta em uma série de modificações na permeabilidade citológica e propriedades ópticas destes patógenos. Estudos anteriores verificaram que a clorexidina reagiu com grupos lipofílicos de células de microrganismos e provocou desorientação da

lipoproteína de membrana dificultando o funcionamento da barreira osmótica(39, 40). As moléculas da clorexidina carregadas positivamente se ligam prontamente às moléculas das paredes celulares carregadas negativamente, e interferem no transporte da membrana, iniciando uma liberação de substâncias de baixo peso molecular (41, 42). Nosso estudo confirma o potencial antimicrobiano da clorexidina, de modo que os corpos de prova imersos nessa solução apresentaram 100% de redução no número de microrganismos quando comparados ao crescimento microbiano sem tratamento (Figura 1). Ainda, efeitos colaterais gerais e sistêmicos da clorexidina são raros, não sendo demonstrados por estudos clínicos de longo prazo, indicando uma baixa toxicidade desse agente(41, 42), o que corrobora com os resultados do nosso estudo, o qual não demonstrou potencial citotóxico dos corpos de prova imersos em clorexidina 4% em contato com as células da conjuntiva humana (Figuras 2 e 3).

O triclosan tem sido utilizado em produtos de cuidados com a pele há mais de 30 anos, promovendo ação antimicrobiana imediata e de amplo espectro quando usado em formulações tópicas adequadas (12, 43). A atividade antimicrobiana do triclosan se dá pela sua difusão para a parede celular bacteriana, rompendo a membrana citoplasmática, o RNA, diminuindo a síntese de proteínas e de lipídeos, e então resultando em inibição ou morte microbiana (44, 45). Uma revisão de literatura realizada por Jones et al. mostra que a efetividade antimicrobiana do Triclosan tem sido testada em formulações comerciais contendo esse agente em diferentes concentrações (0,2 a 2%), embora estudos clínicos e laboratoriais relatam que formulações contendo 1% de triclosan oferecem o equilíbrio ideal entre efetividade antimicrobiana e segurança para o uso em loções de cuidados para com a saúde (12). Um estudo sobre a toxicidade aguda de loções corporais, géis de banho e sabonetes contendo de 0,1 a 1% de triclosan em sua composição foram conduzidos. As substâncias ficaram em contato com a pele por 14 dias e os resultados demonstraram que os produtos contendo até 1% de triclosan não foram irritantes para a pele (43). Esses relatos corroboram

com os resultados encontrados no nosso estudo, onde a concentração de 1% de triclosan promoveu redução de 100% nos biofilmes bacterianos e não apresentou atividade citotóxica nas células da conjuntiva (Figuras 1 a 3, Tabelas 4 e 5).

As pastilhas efervescentes Efferdent® a base de peróxido alcalino também demonstraram ação significativa contra os microrganismos avaliados no nosso estudo (100% de redução), o que corrobora com os resultados de vários outros estudos que avaliaram a eficácia de pastilhas desse tipo na remoção de diferentes biofilmes em resina acrílica de próteses removíveis intra-orais e encontraram resultados satisfatórios (14, 46, 47). A imersão das próteses nesse peróxido alcalino é um método simples de higienização (14). Essas pastilhas são uma combinação de ingredientes ativos, primeiramente designados a atacar constituintes orgânicos depositados na prótese. Quando esses peróxidos são dissolvidos em água, eles se tornam peróxidos de hidrogênio alcalinos, os quais se decompõem, liberando pequenas bolhas de oxigênio com ação mecânica de remover o biofilme das superfícies da prótese. Esses agentes oxidantes ajudam na remoção de manchas e apresentam efeito antimicrobiano (14, 48). Além de ter apresentado excelente ação antimicrobiana, as pastilhas de Efferdent também não demonstraram atividade citotóxica nas células da conjuntiva humana (Tabelas 4 e 5, Figuras 2 e 3). De acordo com Le Coz *et al.* 1999 (17), o principal composto da pastilha possivelmente causador de reações seria o perborato de potássio. Entretanto, o fabricante relata não haver resquícios dessa substância na prótese caso o paciente utilize as pastilhas da forma recomendada, ou seja, enxaguando abundantemente a prótese após o protocolo de desinfecção, tal qual foi realizado em nosso experimento, onde todos os corpos de prova foram enxaguados adequadamente em água corrente por 30 segundos após cada desinfecção, favorecendo a remoção de resíduos da superfície da resina e evitando sua liberação para o extrato que entraria em contato com as células.

Embora o método de limpeza por fricção com sabão neutro tenha causado razoável redução no biofilme, esse grupo apresentou porcentagens de redução estatisticamente menores do que os grupos tratados por imersão em clorexidina 4%, pastilhas efervescentes Efferdent e triclosan 1%. Ainda que poucos estudos tenham avaliado métodos de limpeza de próteses oculares, um dos mais comuns tem sido o uso de água e sabão (2, 49). A fricção com gaze e sabão é considerada um método mecânico de limpeza, semelhantemente ao método de escovação em próteses totais. Um estudo clínico recente apontou que o método de escovação apresentou um melhor efeito em relação à higienização de próteses do que a imersão em soluções de peróxido(50); entretanto, outros estudos relataram que a escovação por si só foi menos efetiva do que a imersão em soluções desinfetantes(51-53), o que corrobora com os resultados do nosso estudo.

Verificamos em nosso estudo que, embora não citotóxico, o sabão neutro apresentou, no geral, os menores valores de proliferação celular. Não há relatos na literatura a respeito do potencial citotóxico desse produto, sendo que até mesmo o fabricante relata ser “delicado e seguro para os olhos e pele”. Sendo assim, uma provável hipótese para os menores valores de proliferação celular desse grupo seria de que, por ser o único grupo que submetido à limpeza mecânica por meio de fricção com gaze embebida no sabão, os corpos de prova podem ter sofrido maior alteração na sua rugosidade e, supostamente, impregnado maior quantidade de solução em sua superfície, sendo esta liberada em maior quantidade para o extrato formado. No estudo de Lira et.al. 2012 (54), que avaliaram a rugosidade superficial de resinas acrílicas de base de dentaduras submetidas à desinfecção mecânica (escovação) e química (imersão em pastilhas efervescentes Efferdent e hipoclorito), o único tratamento que promoveu uma maior rugosidade de superfície foi o mecânico realizado por meio da escovação. Ainda, Pellizzaro et.al. 2012 (55) relatam que embora os efeitos da limpeza mecânica sejam positivos, a fricção

com a resina acrílica pode causar danos nesse material, tais como o desgaste e aumento da rugosidade.

Contrariamente ao sabão neutro, os grupos imersos em citronela apresentaram, no geral, maiores valores de proliferação celular (Tabelas 4 e 5, Figuras 2 e 3). Sabe-se que o uso de plantas medicinais em aplicações bactericidas, antiparasitárias, inseticidas, e cosméticas tem aumentado extensivamente, uma vez que a maioria dos óleos essenciais obtidos dessas plantas é conhecida por não ser tóxica (56-58). Dados de um estudo a respeito da toxicidade aguda da citronela indicaram segurança após administração oral e aplicação tópica da mesma (56, 59). O fato do grupo imerso em citronela apresentar maiores valores de proliferação celular pode estar associado ao poder antioxidante desse fitoterápico. Como demonstrado por muitos estudos, derivados químicos naturais de plantas possuem um efeito de proteção contra a genotoxicidade induzida pelo stress oxidativo (60-62). Dessa forma, as células da conjuntiva humana avaliadas no nosso estudo podem ter sofrido alguma ação protetora decorrente da citronela, e assim, pode ter ocorrido uma maior proliferação das mesmas. Entretanto, esse fitoterápico não apresentou atividade antimicrobiana relevante no nosso estudo (Figura 1).

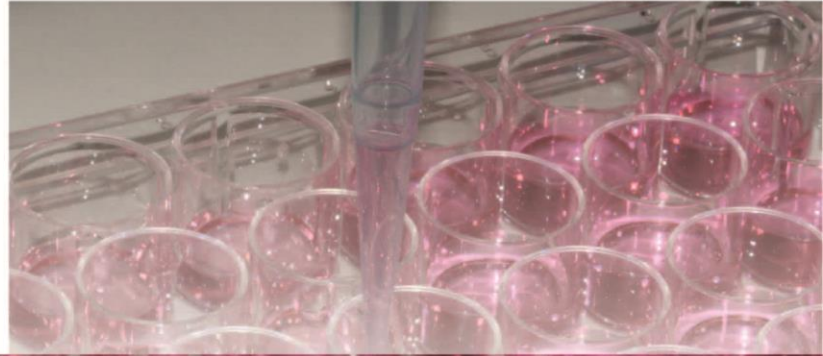
Nesse estudo, o soro fisiológico foi utilizado a fim de simular as condições normais de uso da prótese, buscando se aproximar do meio em que a prótese é utilizada, ou seja, o fluido lacrimal. Assim sendo, essa solução não foi utilizada com propósito antimicrobiano, embora tenha levado a uma pequena diminuição no crescimento microbiano comparado ao grupo não tratado (Figura 1). Como podemos ver, também não foi observada citotoxicidade desse grupo em nenhum dos períodos avaliados (Tabelas 4 e 5, Figuras 2 e 3). De acordo com Retamoso et al.(63) e Saravi et al. (64), a manutenção da resina acrílica em meio aquoso promove a lixiviação de monômeros para esse meio, reduzindo os efeitos deletérios resultantes da irritação química causada pelo meta-metil-metacrilato. Dessa forma, a manutenção dos corpos de prova de resina acrílica em soro fisiológico pode ter ocasionado a liberação de monômero

residual para o mesmo, evitando a citotoxicidade em contato com as células da conjuntiva ocular.

Estudos relatam que, quando imersa em um ambiente aquoso, a resina acrílica tende a absorver uma quantidade do líquido através de difusão, de forma que as moléculas desse líquido podem penetrar na matriz da resina acrílica e se posicionar entre as cadeias poliméricas. Kalion et al 2001 (65) avaliaram a eficácia antimicrobiana de um polímero incorporado com um agente antimicrobiano e relataram que o mesmo permanece encapsulado no interior do corpo do polímero e acaba não se difundindo efetivamente para a superfície. Baseando-se nessas informações, sugere-se que, em nosso estudo, a resina acrílica possa ter absorvido parte das soluções utilizadas, as quais podem ter se encapsulado na matriz polimérica, não sendo liberada ao extrato uma quantidade suficiente para causar alguma reação citotóxica nas células.

Esse estudo foi baseado no fato de que, devido à possibilidade de um vasto número de porosidades e ranhuras na superfície da resina acrílica, poderia haver um acúmulo de soluções residuais nessa superfície, as quais poderiam ser difundidas para o ambiente (42), no caso, o extrato originado dos corpos de prova previamente tratados, o que clinicamente se traduz no fluxo lacrimal em contato com a superfície posterior da prótese ocular. Entretanto, os corpos de prova de resina do nosso estudo receberam polimento completo, simulando o polimento realizado na prótese ocular antes de ser instalada no paciente, recebendo inclusive polimento com solução diamantada de 1 micra em disco de feltro, o que pode ter proporcionado uma alta lisura superficial e pequena rugosidade de superfície, dificultando o acúmulo de soluções ao longo dos períodos, exceto pelos corpos de prova tratados com fricção com sabão neutro, que podem ter sofrido algum tipo de alteração superficial, como já mencionado.

Esse estudo apresenta limitações por ser um estudo *in vitro*, que não reflete todas as condições clínicas do uso da prótese ocular e de sua desinfecção diária. Sendo assim, novos estudos devem ser realizados, avaliando diferentes concentrações de soluções desinfetantes, diferentes rugosidades da resina acrílica, e outros métodos de desinfecção da prótese ocular presentes na literatura e nas indicações clínicas, além de avaliar outras propriedades das resinas acrílicas que podem ser afetadas pelo uso dessas soluções.



3.8 CONCLUSÃO



3.8 CONCLUSÃO

Podemos concluir que dentre os agentes antimicrobianos testados, os mais indicados são a imersão em clorexidina 4%, o uso das pastilhas efervescentes Efferdent® e imersão em triclosan 1%, uma vez que são eficazes na remoção do biofilme bacteriano testado e não apresentam citotoxicidade para as células da conjuntiva humana, independente do período de tratamento.



3.9 REFERÊNCIAS



3.9 REFERÊNCIAS

1. Goiato MC, Fernandes AU, dos Santos DM, Barao VA. Positioning magnets on a multiple/sectional maxillofacial prosthesis. *J Contemp Dent Pract*. 2007;8(7):101-7.
2. Paranhos RM, Batalhao CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci*. 2007;15(1):33-8.
3. Willcox MD. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2013;117:99-105.
4. Gaal V, Kilar F, Acs B, Szijarto Z, Kocsis B, Kustos I. In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;45(3-4):125-30.
5. Uesugui E, Cypel-Gomes MC, Atique D, Goulart DG, Gallucci FR, Nishiwaki-Dantas MC, et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais frequentes e sua suscetibilidade in vitro aos agentes antimicrobianos. *Arq Bras Oftal* 2002. p. 339-42.
6. Brothers KM, Nau AC, Romanowski EG, Shanks RM. Dexamethasone Diffusion Across Contact Lenses Is Inhibited by Staphylococcus epidermidis Biofilms in Vitro. *Cornea*. 2014;33(10):1083-7.
7. Altieri KT, Sanita PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, et al. Eradication of a mature methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J*. 2013;24(5):487-91.
8. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Iyda MG, Rezende MC, Haddad MF. Effect of disinfection and storage on the flexural strength of ocular prosthetic acrylic resins. *Gerodontology*. 2012;29(2):e838-44.

9. Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology*. 2013;30(1):32-9.
10. Pesqueira AA, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Ribeiro Pdo P, Coelho Sinhoreti MA, et al. Effect of disinfection and accelerated aging on color stability of colorless and pigmented facial silicone. *J Prosthodont*. 2011;20(4):305-9.
11. Aiello AE, Larson EL, Levy SB. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? *Clin Infect Dis*. 2007;45 Suppl 2:S137-47.
12. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*. 2000;28(2):184-96.
13. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology*. 2012.
14. de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos Hde F, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology*. 2011;28(4):264-70.
15. Arabaci T, Turkez H, Canakci CF, Ozgoz M. Assessment of cytogenetic and cytotoxic effects of chlorhexidine digluconate on cultured human lymphocytes. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(5):1255-60.
16. Lachapelle JM. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol*. 2014;24(1):3-9.
17. Le Coz CJ, Bezard M. Allergic contact cheilitis due to effervescent dental cleanser: combined responsibilities of the allergen persulfate and prosthesis porosity. *Contact Dermatitis*. 1999;41(5):268-71.

18. Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(1):652-9.
19. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Cell viability score as an integrated indicator for cytotoxicity of benzalkonium chloride-containing antiglaucoma eyedrops. *Biocontrol Sci.* 2012;17(3):121-8.
20. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1995;8(2):122-8.
21. Bal BT, Yilmaz H, Aydin C, Karakoca S, Yilmaz S. In vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: effect of accelerated aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;89(1):122-6.
22. Santos DM, Nagay BE, da Silva EV, Bonatto Lda R, Sonogo MV, Moreno A, et al. In vitro analysis of different properties of acrylic resins for ocular prosthesis submitted to accelerated aging with or without photopolymerized glaze. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;69:995-1003.
23. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont.* 2012;21(1):7-15.
24. Goiato MC, Haddad MF, Pesqueira AA, Moreno A, Dos Santos DM, Bannwart LC. Effect of chemical disinfection and accelerated aging on color stability of maxillofacial silicone with opacifiers. *J Prosthodont.* 2011;20(7):566-9.
25. Filie Haddad M, Coelho Goiato M, Micheline Dos Santos D, Moreno A, Filipe D'almeida N, Alves Pesqueira A. Color stability of maxillofacial silicone with nanoparticle

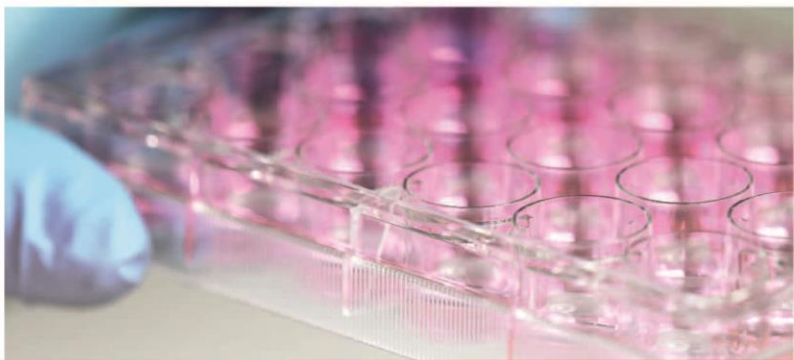
- pigment and opacifier submitted to disinfection and artificial aging. *J Biomed Opt.* 2011;16(9):095004.
26. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007;24(1):52-7.
 27. Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(3):642-52.
 28. Baudouin C, Riancho L, Warnet JM, Brignole F. In vitro studies of antiglaucomatous prostaglandin analogues: travoprost with and without benzalkonium chloride and preserved latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4123-8.
 29. da Silva EV, Goiato MC, Dos Santos DM, Bonatto LD, Brito VG, de Oliveira SH. Effect of different methods of polymerizing ocular prosthesis acrylic resin on a human conjunctival cell line. *J Prosthet Dent.* 2016;116(5):818-23.
 30. da Silva EVF, Goiato MC, Bonatto LDR, de Medeiros RA, Santos DMD, Rangel EC, et al. Toxicity analysis of ocular prosthesis acrylic resin with or without pigment incorporation in human conjunctival cell line. *Toxicol In Vitro.* 2016;36:180-5.
 31. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004;17(3):340-4.
 32. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostene W, Baudouin C, Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* 2012;18:851-63.

33. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*. 2010;316(7):1271-81.
34. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014;5(2):69-76.
35. Bural C, Aktas E, Deniz G, Unlucerci Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(4):306-12.
36. Sigusch BW, Pflaum T, Volpel A, Schinkel M, Jandt KD. The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater*. 2009;25(11):1446-52.
37. Gjermo P. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva:ISO; 2009. Geneva2009.
38. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 1986;112(6):863-9.
39. Altieri KT, Sanita PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Dent Assoc*. 2012;143(3):270-7.
40. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(5):1031-6.

41. The Soap and Detergent Association and The Cosmetic T, attachments. aFALtWGa, 13. FPDN-HJ.
42. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003;30(5):532-6.
43. Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control*. 1996;24(3):209-18.
44. Meincke BE, Kranz RG, Lynch DL. Effect of irgasan on bacterial growth and its adsorption into the cell wall. *Microbios*. 1980;28(113-114):133-47.
45. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*. 1998;394(6693):531-2.
46. 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.
47. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, et al. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009;18(5):427-31.
48. Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979;42(6):619-23.
49. Nuti Sobrinho A, Garcia de Lima E, Mattos MG, Watanabe I. A study of ocular prostheses. I. Manufacture and indications for use. *Rev Fac Odontol Ribeiro Preto*. 1986;23(2):135-43.
50. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2007;34(8):606-12.

51. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc.* 1991;57(12):937-9.
52. Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent.* 1988;60(4):467-70.
53. Kulak Y, Arikan A, Albak S, Okar I, Kazazoglu E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners: surface contaminant removal from dentures. *J Oral Rehabil.* 1997;24(3):209-15.
54. Lira AF, Consani RL, Mesquita MF, Nobilo MA, Henriques GE. Effect of toothbrushing, chemical disinfection and thermocycling procedures on the surface microroughness of denture base acrylic resins. *Gerodontology.* 2012;29(2):e891-7.
55. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanita 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.
56. Costa CA, Bidinotto LT, Takahira RK, Salvadori DM, Barbisan LF, Costa M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2268-72.
57. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
58. Fandohan P, Gnonlonfin B, Laleye A, Gbenou JD, Darboux R, Moudachirou M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(7):2493-7.

59. Opdyke D J L. Monographs on fragrance raw materials. Food Cosmet. Toxicol.: Food Cosmet. Toxicol.; 1976. p. 455-7.
60. Sinha S, Biswas D, Mukherjee A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. J Ethnopharmacol. 2011;137(3):1521-7.
61. Glei M, Pool-Zobel BL. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. Toxicol In Vitro. 2006;20(3):295-300.
62. Plazar J, Filipic M, Groothuis GM. Antigenotoxic effect of Xanthohumol in rat liver slices. Toxicol In Vitro. 2008;22(2):318-27.
63. Retamoso LB, da Cunha Tde M, Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Romanos MT, et al. In vitro cytotoxicity of self-curing acrylic resins of different colors. Dental Press J Orthod. 2014;19(4):66-70.
64. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. J Dent (Tehran). 2012;9(4):180-8.
65. Kalyon BD, Olgun U. Antibacterial efficacy of triclosan-incorporated polymers. Am J Infect Control. 2001;29(2):124-5.



4.1 Referências da Introdução Geral

1. Goiato MC, Fernandes AU, dos Santos DM, Barao VA. Positioning magnets on a multiple/sectional maxillofacial prosthesis. *J Contemp Dent Pract.* 2007;8(7):101-7.
2. Paranhos RM, Batalhao CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(1):33-8.
3. Willcox MD. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2013;117:99-105.
4. Gaal V, Kilar F, Acs B, Szijjarto Z, Kocsis B, Kustos I. In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;45(3-4):125-30.
5. Uesugui E, Cypel-Gomes MC, Atique D, Goulart DG, Gallucci FR, Nishiwaki-Dantas MC, et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares maisfreqüentes e sua suscetibilidade in vitro aos agentes antimicrobianos. *Arq Bras Oftal* 2002. p. 339-42.
6. Brothers KM, Nau AC, Romanowski EG, Shanks RM. Dexamethasone Diffusion Across Contact Lenses Is Inhibited by Staphylococcus epidermidis Biofilms in Vitro. *Cornea.* 2014;33(10):1083-7.
7. Altieri KT, Sanita PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, et al. Eradication of a mature methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J.* 2013;24(5):487-91.
8. Katsikogianni M1, Missirlis YF.. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater,* 2004; Dec 7;8:37-57.
9. Busscher HJ, van der Mei HC.. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res,* 1997; Apr;11(1):24-32.

10. Gottenbos B1, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Grijsma DW, Feijen J. Initial adhesion and surface growth of *Pseudomonas aeruginosa* on negatively and positively charged poly(methacrylates). *J Mater Sci Mater Med*, 1999; Dec;10(12):853-5.
11. Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA. Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *J Colloid Interface Sci*, 1998; Dec 1;208(1):23-33.
12. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M.. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 2006; Oct;17 Suppl 2:68-81.
13. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009; Jul-Aug;24(4):616-26.
14. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*, 1993; Sep;72(9):1304-9.
15. Yoda I, Koseki H1, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, et al. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol*, 2014; Sep 2;14:234.
16. Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone. *Int J Biomater*, 2009;2009:718017. doi: 10.1155/2009/718017. Epub 2009 Jan 25
17. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Iyda MG, Rezende MC, Haddad MF. Effect of disinfection and storage on the flexural strength of ocular prosthetic acrylic resins. *Gerodontology*. 2012;29(2):e838-44.

18. Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology*. 2013;30(1):32-9.
19. Pesqueira AA, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Ribeiro Pdo P, Coelho Sinhoreti MA, et al. Effect of disinfection and accelerated aging on color stability of colorless and pigmented facial silicone. *J Prosthodont*. 2011;20(4):305-9.
20. Aiello AE, Larson EL, Levy SB. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? *Clin Infect Dis*. 2007;45 Suppl 2:S137-47.
21. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology*. 2012.
22. de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos Hde F, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology*. 2011;28(4):264-70.
23. Tadtong S, Watthanachaiyingcharoen R, Kamkaen N. Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Nat Prod Commun*. 2014;9(2):277-80.
24. Bassolé IHN, Lamien-Meda A, Bayala B, Obame LC, Ilboudo AJ, Franz C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. 2011;18(12):1070-4.
25. Khadri A, Neffati M, Smiti S, Falé P, Lino ARL, Serralheiro MLM, et al. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Science and Technology*. 2010;43(2):331-6.
26. Abena AA, Gbenou JD, Yayi E, Moudachirou M, Ongoka RP, Ouamba JM, et al. Comparative chemical and analgesic properties of essential oils of *Cymbopogon nardus* (L)

- Rendle of Benin and Congo. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2007;4(3):267-72.
27. de Billerbeck VG, Roques CG, Bessiere JM, Fonvieille JL, Dargent R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol*. 2001;47(1):9-17.
 28. Viana GS, Vale TG, Pinho RS, Matos FJ. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2000;70(3):323-7.
 29. Le Coz CJ, Bezard M. Allergic contact cheilitis due to effervescent dental cleanser: combined responsibilities of the allergen persulfate and prosthesis porosity. *Contact Dermatitis*. 1999;41(5):268-271.
 30. Lachapelle JM. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol*. 2014;24(1):3-9.
 31. Arabaci T, Turkez H, Canakci CF, Ozgoz M. Assessment of cytogenetic and cytotoxic effects of chlorhexidine digluconate on cultured human lymphocytes. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(5):1255-60.
 32. Lachapelle JM. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol*. 2014;24(1):3-9.
 33. Le Coz CJ, Bezard M. Allergic contact cheilitis due to effervescent dental cleanser: combined responsibilities of the allergen persulfate and prosthesis porosity. *Contact Dermatitis*. 1999;41(5):268-71.
 34. Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):652-9.

35. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1995;8(2):122-8.
36. 27. Bal BT, Yilmaz H, Aydin C, Karakoca S, Yilmaz S. In vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: effect of accelerated aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;89(1):122-6.

4.2 Normas do periódico LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY para envio do artigo referente ao Capítulo 1

Author Guidelines

Letters in Applied Microbiology provides for the rapid publication of short, high quality papers in the broad field of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, antimicrobials, water and biodeterioration. Advances in rapid methodology are a particular feature. The Journal reflects developments in biotechnology in such fields as applied microbial genetics, immunodiagnosis and fermentation science.

In May 2012, *Letters in Applied Microbiology* changed its focus to emphasise the significance and impact of the work presented. [Click here to read the Editorial announcing the new focus.](#)

CONTACTS AND QUICK LINKS

[Author Submission Checklist](#)

[Contact the Editorial Office](#)

[Contact the Production Editor](#)

[Submit your manuscript now to *Letters in Applied Microbiology*](#)

[Click here to download the Colour Work Agreement Form](#)

[Guidelines for Electronic Graphics](#)

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide

readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Reviews

Review articles submitted to LAM will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology with a particular emphasis on translational research and impact. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest, relevance and significant changes and impact. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The Chief Editor then assigns the manuscript to a handling Editor, who assesses the manuscript for suitability in the journal. At this screening stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal, and authors should not expect full comments if papers are rejected at this stage. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the Editorial Office for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript. Authors may be advised that sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Letters in Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the [ARRIVE guidelines](#) before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult

a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Biosecurity

The Journal asks authors of papers related to [Schedule 5 biological agents](#) to inform the Editor at the time of manuscript submission if their study has the potential for both benevolent and malevolent application. This is often referred to as “dual use research of concern”. The [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines state that a “dual use research of concern” can arise in relation to “research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material”.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. “E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)”. Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, [MicrobiologyOpen](#) and [Food Science & Nutrition](#), to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. For review purposes submitted papers (both original and revised articles) must be formatted with continuous line numbering and double spaced text throughout. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

Cover letter

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in Letters is at a premium, individual papers have a limit of approximately 4000 words, with no more than five figures and tables in total. The Editors reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscript. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the [author submission checklist](#) to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY:** This highlight section should explain the significance and impact of the manuscript in up to 100 words. [Click here](#) to read more about what should be included in this section.
- **ABSTRACT:** A brief summary of up to 200 words, the abstract should give the major findings of the investigation. The text should be unstructured, with no section headings. A list of between five and eight keywords should also be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **RESULTS AND DISCUSSION (combined):** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of this section as they convey the major observations to readers. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the significance and impact of the principal findings of the study.
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;

- CONFLICT OF INTEREST: If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- REFERENCES;
- SUPPORTING INFORMATION (if applicable): Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

The headings in review articles are of the author's choice. There is no requirement for review articles to have a 'significance and impact' section; this is at the discretion of the author. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only.

Please check and confirm that your article is optimized for search engines. Keywords should appear in the title, abstract and throughout your article in order to increase your article's online visibility. For more information please see [Writing for SEO](#).

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

As space in LAM is at a premium, manuscripts must contain no more than five figures and tables IN TOTAL.

Tables

Tables must be prepared in the same format as the manuscript text, and should ideally appear at the end of the main manuscript file. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

Figures should be uploaded to the online submission site as separate files. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a ‘Save as...’ or ‘Export...’ feature to allow you to do this
- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi

- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for printed colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from [here](#) and should be sent to the provided address on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulphur, sulphate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the

same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free animals* are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. [Visit our site](#) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

AFTER ACCEPTANCE**Accepted Articles**

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, and are given a Digital Object Identifier (DOI) which allows them to be cited and tracked. A completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article. Once the manuscript has been through the production process the article is removed from the Accepted Articles area and published as Early View.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Letters in Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF

offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

4.3 Normas do periódico **BIOFOULING**, para envio do artigo referente ao **Capítulo 2**.

Instructions for Authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#). This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Use these instructions if you are preparing a manuscript to submit to *Biofouling*. To explore our journals portfolio, visit <http://www.tandfonline.com/>, and for more author resources, visit our [Author Services website](#).

Biofouling is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. All submitted manuscripts are subject to initial appraisal by the editor, and, if found suitable for further consideration, to peer review by independent, anonymous, expert referees. Authors who would like their papers double-blind peer reviewed should submit the title page separately. Submission is online via [ScholarOne Manuscripts](#).

***Biofouling* is a rapid online publication and aims to publish papers within 28 days of receipt of the accepted paper into the production process. This process, however, relies upon the author adhering to the following deadlines:**

- **immediate return of the author publishing agreement**
- **return of corrections within 48 hours of receiving proofs.**

Delay on either of these points can postpone publication time.

***Biofouling* considers all manuscripts on the strict condition that:**

- the manuscript is your own original work, and does not duplicate any other previously published work, including your own previously published work
- the manuscript has been submitted only to *Biofouling*; it is not under consideration or peer review or accepted for publication or in press or published elsewhere
- the manuscript contains nothing that is abusive, defamatory, libellous, obscene, fraudulent, or illegal.

Please note that *Biofouling* uses **CrossCheck™** software to screen manuscripts for unoriginal material. By submitting your manuscript to *Biofouling* you are agreeing to any necessary originality checks your manuscript may have to undergo during the peer review and production processes.

Any author who fails to adhere to the above conditions will be charged with costs which *Biofouling* incurs for their manuscript at the discretion of *Biofouling*'s editors and Taylor & Francis, and their manuscript will be rejected.

This journal is compliant with the Research Council's UK OA policy. Please see the licence options and embargo periods [here](#).

Manuscript preparation

1. General guidelines

On the title page, please give the word count of your paper, as follows:

¹ Text:

² References:

³ Figures:

⁴ Tables:

¹ Include the Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, table titles and all figure captions. Do not include the title page, author list and affiliations, any words that form part of a table or figure, the reference list, and supplemental material, as these are excluded from the word count.

² Give the word number but do not include in the total

^{3,4} Give the word number (or word equivalents), but do not include in the total.

Manuscripts should normally be no more than 8,000 words and should not contain more than 10 figures (excluding supplemental material). However, this can be reviewed on a case-by-case basis in consultation with the editor if necessary.

Authors who would like to submit mini-reviews or reviews should discuss them with the editor-in-chief or an associate editor beforehand. Mini-reviews should not exceed 7,000 words and reviews should be no longer than 9,000 words (excluding references). They should provide an original critical appraisal of the subject area which adds to the existing body of knowledge and indicates directions for further exploration.

Manuscripts are accepted only in English. Either American or British English spelling may be used, but must be consistent within an article. Please use single quotation marks, except where ‘a quotation is “within” a quotation’.

- For clarity, authors are requested to use the simple past tense for stating what was done, either by others or by themselves, including the procedures, observations, and data of the study being reported. The Materials and Methods and Results sections should be written exclusively in the past tense. Present tense is correct for statements of fact and when reporting your own general conclusions. For more guidance please click here.
- Papers should be written in the third person using the passive voice. Please avoid the use of first and second person pronouns ('I', 'we', 'our', 'you', 'your').
- Non-English speaking authors should have their manuscripts checked for correct use of English before submission.
- For further information on language editing and translation services and correctly preparing a manuscript for submission please visit the Taylor & Francis Author Services website
- Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text; acknowledgments; references; tables(s) with caption(s) (on individual pages); figure(s) with caption(s) (as a list); supplemental material (as appropriate).
- Abstracts of 100-150 words are required for all manuscripts submitted.
- Each manuscript should have up to 6 keywords.
- In the Materials & Methods section, full details must be given of all the materials used, such that the work could be repeated exactly by other investigators. Where specific products are named, the manufacturer's name and location (city and country) must be included.
- Search engine optimization (SEO) is a means of making articles more visible. Please consult our guidance here.

- Section headings should be concise. Level 1 : **Bold, Lower case**; Level 2: ***Bold, italic*** ; Level 3: *Non-bold, italic*; Level 4: *Italic followed by a dot*, then lead straight on into text.
- The first mention in the text of the Latin name(s) of species used in an investigation should include the full generic and specific name(s), together with the authority. Thereafter, the generic name(s) may be abbreviated to the initial capital letter. All Latin binominals should be italicised (but not in italicised subheadings), but NOT the names of phylla, classes or orders.
- All the authors of a manuscript should include their names, affiliations, postal addresses, telephone numbers and email addresses on the cover page of the manuscript. One author should be identified as the corresponding author. The affiliations of all named co-authors should be the affiliation where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer review process, the new affiliation can be given as a footnote. No changes to affiliation can be made after a manuscript has been accepted. The email address of the corresponding author will be published in the article.
- All persons who have a reasonable claim to authorship must be named in the manuscript as co-authors; the corresponding author must be authorised by all co-authors to act as an agent on their behalf in all matters pertaining to publication of the manuscript, and the order of names should be agreed by all authors.
- Biographical notes on contributors are not required.
- Please supply all details required by any funding and grant-awarding bodies under the heading Funding in a separate paragraph as follows:

For single agency grants

This work was supported by the <Funding Agency> under Grant [number xxxx].

For multiple agency grants

This work was supported by the <Funding Agency #1> under Grant [number xxxx]; <Funding Agency #2> under Grant [number xxxx]; and <Funding Agency #3> under Grant [number xxxx>]. Funding information should appear on the title page of the manuscript.

- Authors must also incorporate a **Disclosure Statement** which will acknowledge any financial interest or benefit they have arising from the direct applications of their research.
- For all manuscripts non-discriminatory language is mandatory. Sexist or racist terms must not be used.
- Authors must adhere to SI units (eg mg l⁻¹; µg m⁻³; CFU cm⁻²; mW m⁻² s⁻¹). Units are not italicised.
- Please note that dots are not used in abbreviations such as 'eg' and 'ie'.
- Poster presentations and conference papers cannot be cited unless they are documented in published proceedings accessible to everyone. Therefore please ignore the conference paper and conference poster section of the reference guide. The name of the publisher and the place of publication and the page numbers of the article must be clearly stated in all cases. Where a reference is only available online, please include the doi or url.
- When using a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ® or ™.

2. Style guidelines

- Description of the Journal's article style
- Description of the Journal's reference style
- No more than 5 text citations are permitted in support of any statement made.
- The reference list should be arranged alphabetically and chronologically.
- Papers submitted to, but not accepted by, a named journal may not be cited.

- Papers accepted by a named journal but not yet published should be cited in the text and reference list as Names of Authors/Year/Forthcoming. Please include the doi if one is available.
- Guide to using mathematical symbols and equations

3. Tables and figures

- It is in the author's interest to provide the highest quality figure format possible. **Please be sure that all imported scanned material is scanned at the appropriate resolution: 1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour and halftones (photographs).**
- Figures must be saved separately to text. Please do not embed figures in the manuscript file.
- Figure files should be saved as one of the following formats: TIFF (tagged image file format), PostScript or EPS (encapsulated PostScript), and should contain all the necessary font information and the source file of the application (e.g. CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).
- Tables and equations must be submitted in a format which can be edited (eg Word) and not as images.
- All tables and figures must be numbered consecutively in the order in which they appear in the manuscript (e.g. Table 1, Table 2, Figure 1, Figure 2). In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. Table 1a, Table 2b, Figure 1a, Figure 1b). Figures and tables should be numbered in the order in which they are cited in the text.
- Table and figure captions must be saved separately, as part of the file containing the complete text of the manuscript, and numbered correspondingly.
- The filename for a graphic should be descriptive of the graphic, e.g. Figure1, Figure2a.

- All microscope images must show a clear, well-defined scale bar, with its value.

4. Publication charges

Submission fee

There is no submission fee for *Biofouling*.

Page charges

There are no page charges for *Biofouling*.

Colour charges

Online colour publication is free, and the journal has a limited print colour budget. Authors should restrict their use of colour to situations where it is necessary on scientific, and not merely cosmetic, grounds. If it is necessary for figures to be reproduced in colour in the print version, a charge may apply. Charges for colour figures are £250 per figure (\$395 US Dollars; \$385 Australian Dollars; 315 Euros). If you wish to have more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$80 US Dollars; \$75 Australian Dollars; 63 Euros).

Depending on your location, these charges may be subject to Value Added Tax.

5. Compliance with ethics of experimentation

- Authors must ensure that research reported in submitted manuscripts has been conducted in an ethical and responsible manner, in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All manuscripts which report *in vivo* experiments or clinical trials on humans or animals must include a written Statement in the Methods section that such work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees, and that clinical trials have been registered as legislation requires.

- Authors must confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment or clinical trial who is described in the manuscript has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, and that they acknowledge that they cannot be identified via the manuscript; and that authors have anonymised them and do not identify them in any way. Where such a person is deceased, authors must warrant they have obtained the written consent of the deceased person's family or estate.
- Authors must confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in the manuscript; and that the manuscript contains all appropriate warnings concerning any specific and particular hazards that may be involved in carrying out experiments or procedures described in the manuscript or involved in instructions, materials, or formulae in the manuscript; and include explicitly relevant safety precautions; and cite, and if an accepted standard or code of practice is relevant, a reference to the relevant standard or code. Authors working in animal science may find it useful to consult the [Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching](#).

6. Reproduction of copyright material

If you wish to include any material in your manuscript in which you do not hold copyright, you must obtain written permission from the copyright owner, prior to submission. Such material may be in the form of text, data, table, illustration, photograph, line drawing, audio clip, video clip, film still, and screenshot, and any supplemental material you propose to include. This applies to direct (verbatim or facsimile) reproduction as well as “derivative reproduction” (where you have created a new figure or table which derives substantially from a copyrighted source). You must ensure appropriate acknowledgement is given to the permission granted to you for reuse by the copyright holder in each figure or table caption.

You are solely responsible for any fees which the copyright holder may charge for reuse. The reproduction of short extracts of text, excluding poetry and song lyrics, for the purposes of criticism may be possible without formal permission on the basis that the quotation is reproduced accurately and full attribution is given. For further information and FAQs on the reproduction of copyright material, please consult our [Guide](#) .

7. Supplemental online material

Authors are strongly encouraged to submit their datasets, animations, movie files, sound files or any additional information for online publication. This will appear in a 'Supplemental Material' tab along with your article when it is published online. **Supplemental material must be clearly labelled as such and submitted separately from the main document, either as one file or, where there are several files, one zipped file.**

- [Information about supplemental online material](#)

Manuscript submission

All submissions should be made online at the [BiofoulingScholarOne Manuscripts site](#). New users should first create an account. Once logged on to the site, submissions should be made via the Author Centre. Online user guides and access to a helpdesk are available on this website. Manuscripts may be submitted in any standard format, including Word and EndNote. These files will be automatically converted into a PDF file for the review process. LaTeX files should be converted to PDF prior to submission because ScholarOne is not able to convert LaTeX files into PDFs directly. Revised manuscripts must be submitted within 2 months of conditional acceptance subject to satisfactory revision. Authors should send the final, revised version and all tables, equations, and captions in Word or similar format so they

can be edited and typeset. Click here for [information regarding anonymous peer review](#).

Copyright and authors' rights

To assure the integrity, dissemination, and protection against copyright infringement of published articles, you will be asked to assign us, via a Publishing Agreement, the copyright in your article. Your Article is defined as the final, definitive, and citable Version of Record, and includes: (a) the accepted manuscript in its final form, including the abstract, text, bibliography, and all accompanying tables, illustrations, data; and (b) any supplemental material hosted by Taylor & Francis. Our Publishing Agreement with you will constitute the entire agreement and the sole understanding between you and us; no amendment, addendum, or other communication will be taken into account when interpreting your and our rights and obligations under this Agreement. Copyright policy is explained in detail [here](#).

Free article access

As an author, you will receive free access to your article on Taylor & Francis Online. You will be given access to the *My authored works* section of Taylor & Francis Online, which shows you all your published articles. You can easily view, read, and download your published articles from there

In addition, if someone has cited your article, you will be able to see this information. We are committed to promoting and increasing the visibility of your article and have provided this guidance <http://journalauthors.tandf.co.uk/beyondpublication/promotearticle.asp> on how you can help. Also within *My authored works*, author eprints allow you as an author to quickly and easily give anyone free access to the electronic version of your article so that your friends and contacts can read and download your published article for free. This applies to all authors (not just the corresponding author).

Reprints and journal copies

For enquiries regarding reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk . To order a copy of the issue containing your article, please contact our Customer Services team at Adhoc@tandf.co.uk .

Open Access

Taylor & Francis Open Select provides authors or their research sponsors and funders with the option of paying a publishing fee and thereby making an article permanently available for free online access – *Open Access* – immediately on publication to anyone, anywhere, at any time. This option is made available once an article has been accepted in peer review.

[Full details of our Open Access programme](#)

Page last updated 22 September 2016