

# UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**ERICA RAQUEL TRISTAO**

**EFEITO DO ETIL-CIANOACRILATO (SUPER  
BONDER®) E DO POLIDOR LIQUIDO DE BAIXA  
VISCOSIDADE (BISCOVER®) SOBRE BIOFILME DE  
*CANDIDA ALBICANS* EM RESINA ACRILICA PARA  
REEMBASAMENTO**

BAURU  
2016

**ERICA RAQUEL TRISTAO**

**EFEITO DO ETIL-CIANOACRILATO (SUPER  
BONDER®) E DO POLIDOR LIQUIDO DE BAIXA  
VISCOSIDADE (BISCOVER®) SOBRE BIOFILME DE  
*CANDIDA ALBICANS* EM RESINA ACRILICA PARA  
REEMBASAMENTO**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob a supervisão da Profa. Dra. Flora Freitas Fernandes Távora.

BAURU  
2016

T838e	<p>Tristão, Érica Raquel</p> <p>Efeito do etil- cianocrilato (Super Bonder) e do polidor líquido de baixa viscosidade (Biscover) sobre biofilme de Candida Albicans em resina acrílica para reembasamento / Érica Raquel Tristão. -- 2016. 40f. : il.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Flora Freitas Fernandes Tavora.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p>1. Resina Fotopolimerizavel. 2. Etil-cianoacrilato. 3. Biofilme Candida Albicans. I. Távora, Flora Freitas Fernandes. II. Título.</p>
-------	---

**ERIKA RAQUEL TRISTAO**

**EFEITO DO ETIL-CIANOACRILATO (SUPER BONDER®) E DO  
POLIDOR LIQUIDO DE BAIXA VISCOSIDADE (BISCOVER®) SOBRE  
BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* EM RESINA ACRILICA PARA  
REEMBASAMENTO.**

Banca examinadora

-----  
Profª. Dra. Flora Freitas Fernandes Távora  
(Universidade do Sagrado Coração)

-----  
Profª. Dra. Carolina Ortigosa Cunha  
(Universidade do Sagrado Coração)

-----  
Prof. Dra. Regina Magrini Guedes de Azevedo  
(Universidade do Sagrado Coração)

Bauru, 09 de Dezembro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Nenhuma batalha é vencida sozinha. No decorrer dessa luta algumas pessoas estiveram ao meu lado e percorreram esse caminho como verdadeiros soldados, estimulando que eu buscasse a minha vida e conquistasse meu sonho.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por permitir percorrer esse caminho com saúde e me deu forças para chegar onde estou.

Agradeço de forma especial ao meu pai Davi Tristão e minha mãe Rosagela Jovelli, que não só nesse momento, mas em toda minha vida estiveram comigo, fornecendo apoio e compreensão por não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiantes.

Agradeço meu Avô e minha Avó, que me deram todos os conselhos, mimos e incentivos.

Agradeço aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado, me incentivando, me aconselhando e me apoiando.

Agradeço a minha Orientadora Dr: Flora Tavora pela sua dedicação, atenção, paciência e orientação nesse trabalho.

Agradeço os professores da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a esse estudo.

## RESUMO

A proposta desse trabalho foi verificar através de microscopia confocal de varredura a laser, se a utilização de uma resina fotopolimerizável de baixa viscosidade (Biscover®) e do etil-cianoacrilato (Super Bonder®) seriam eficientes em prevenir ou reduzir a formação de biofilme de *Candida albicans*. Cinquenta e seis corpos de prova em resina acrílica para reembasamento (New Truliner) foram divididos aleatoriamente em 7 grupos: G1 (C)- Controle; G2 (SBAE)- Recebeu uma camada de Super Bonder® em sua superfície antes de esterilizar; G3 (SBDE)- Recebeu uma camada de Super Bonder® em sua superfície depois de esterilizar; G4 (SB3G)- 3 gotas de Super Bonder® incorporadas na resina; G5 (SB4G)- 4 gotas de Super Bonder® incorporadas na resina; G6 (BCDE)- Recebeu uma camada de Biscover® em sua superfície depois de esterilizar e G7 (BCAE) – Recebeu uma camada de Biscover® em sua superfície antes de esterilizar. Todos os corpos de prova foram inoculados com *Candida albicans* para formação de biofilme. Os biofilmes remanescentes sobre os corpos de prova foram corados através dos fluorocromos SYTO-9 e iodeto de propídeo para análise no microscópio confocal. Através da análise das imagens geradas pelo microscópio confocal, pôde-se observar que nos grupos G2(SBAE) e G3(SBDE) os campos apresentaram um reduzido número de células fúngicas e a maioria se encontrava na forma de levedura (inócua), enquanto que, para os demais grupos, além de observado um elevado número de células, a maioria destas se apresentava em forma de hifa (patogênica). Desse modo, a partir das condições experimentais desse estudo pôde-se concluir que as modificações do material testado com a Super Bonder® aplicada em sua superfície podem ser uma abordagem potencialmente útil para reduzir ou controlar a formação do biofilme em resinas acrílicas.

**Palavras-chave<sup>#</sup>:** Estomatite sob Prótese; Reembasadores de Dentadura; *Candida albicans*; Microscopia confocal; cianoacrilatos

## ABSTRACT

The purpose of this study was to verify, using the confocal laser scanning microscopy (CLSM), if the use of a photoactivated resin of low viscosity (Biscover®) and a ethyl-cyanoacrylate (Super Bonder®) could be efficient in the prevention or reduction of *Candida albicans* biofilms. Fifty six relines resin specimens (New Truliner) were fabricated and randomly divided into 7 groups: G1 (C)- Control; G2 (SBAE)- a Super Bonder® layer was applied on the surface before sterilization; G3 (SBDE)- the surface received a Super Bonder® layer after sterilization; G4 (SB3G)- 3 drops of Super Bonder® were incorporated in the structure of the resin; G5 (SB4G)- 4 drops of Super Bonder® were incorporated in the structure of the resin; G6 (BCDE)- a Biscover® layer was applied on the surface after sterilization; G7 (BCAE) – the surface received a Biscover® layer before sterilization. All the specimens were inoculated with *Candida albicans* for biofilm development. The remaining biofilms on the specimens were stained with fluorochromes SYTO-9 and propidium iodide to be analyzed by CLSM. Analyzing the images produced by CLSM it was possible to see that groups G2(SBAE) e G3(SBDE) showed a reduced number of cells, and they were in a less pathogenetic form (Yeast), while the other groups showed a high number of cells in a more pathogenetic form (Hyphae). Considering the experimental conditions of this study we can conclude that the material modifications done with Super Bonder® on the surface could be an interesting way to prevent or control biofilm formation on acrylic resin.

**Key-words:** Denture Stomatitis; Denture Liners; *Candida albicans*; confocal microscopy; Cyanoacrylates.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA-----</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS-----</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL E METODOS-----</b>	<b>17</b>
<b>4.RESULTADOS-----</b>	<b>25</b>
<b>5.DISSCUSSAO-----</b>	<b>29</b>
<b>6.CONCLUSAO-----</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>36</b>



## 1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

Apesar de toda a preocupação dos cirurgiões dentistas em manter a saúde oral dos pacientes através da preservação dos dentes remanescentes e das diversas técnicas restauradoras existentes na Odontologia, ainda é elevado o número de usuários de próteses totais removíveis. Esses aparelhos constituem-se de dentes artificiais de resina acrílica, os quais são fixados a uma base do mesmo material.

A limpeza da prótese total é geralmente pobre e parece ser negligenciada tanto pelos pacientes quanto pelos dentistas, já que freqüentemente ambos desconhecem um protocolo bem definido de limpeza e desinfecção. Esse fato é preocupante, pois a prótese total apresenta uma superfície externa polida mecanicamente e outra interna irregular e que não recebe polimento, ambas expostas ao meio bucal e propensas ao acúmulo de alimentos e adesão de microorganismos (LINN et al., 1999). Alguns estudos observaram que as áreas irregulares e rugosas das próteses totais acumulam mais biofilme e, por isso, os pacientes precisam dispor de uma maior atenção durante a higienização dessas áreas (KENG; LIM, 1996; PARANHOS et al., 2007; VERRAN; MARYAN, 1997). Além disso, a superfície da prótese geralmente apresenta microporosidades que facilitam o acúmulo de microorganismos difíceis de serem removidos através de métodos mecânicos (BAYSAN; WHILEY; WRIGHT, 1998; BUDTZ-JORGENSEN, 1979).

Vale ressaltar que a grande maioria dos usuários de próteses totais são pessoas idosas que podem ter a qualidade da sua higiene comprometida devido à diminuição da sua atenção e coordenação motora. Nesses casos a superfície interna da prótese é considerada uma área crítica para o desenvolvimento de processos patológicos, por estar em íntimo contato com os tecidos de suporte e sua topografia promover um aumento da área e nichos de retenção que favorecem a aderência de microorganismos e a formação de biofilme (SHAY, 2002).

Assim, atenção deve ser dada à importância do controle do biofilme sobre a prótese total (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; RADFORD, 1999).

### 1.1 *Candida albicans*

O fungo do gênero *Candida* pode ser encontrado em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis (AKPAN; MORGAN, 2002; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003) como um organismo comensal, não causando danos aparentes nem induzindo inflamação nos tecidos adjacentes (AKPAN; MORGAN, 2002; DONGARI-BAGTZOGLU; FIDEL, 2005; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Contudo, sob certas condições predisponentes, o fungo pode multiplicar-se, tornando-se patogênico, e penetrar nos tecidos do hospedeiro causando inflamação e destruição tecidual (DONGARI-BAGTZOGLU; FIDEL, 2005; HUBE, 2004; KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006)

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas, mas somente 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). As espécies mais comuns são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guillierimondii*, *C. Krusei* (AKPAN; MORGAN, 2002; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000), *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (AKPAN; MORGAN, 2002.)

A *C. albicans* pode ser classificada como um fungo assexual diplóide, (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999) de forma arredondada ou ovalada, de 3 a 5µm, Gram positivo e com metabolismo principalmente aeróbio (UREÑA, 1995). Pode-se apresentar na fase de levedura (inócua) ou na fase de hifa ou micelial (patogênica) (BUNETEL; BONNAURE-MALLET, 1996; ROGERS; BALISH, 1980).

### 1.2 Estomatite por prótese total

A estomatite por prótese total (EP) é definida como um processo inflamatório da mucosa oral associado à utilização de prótese total removível. A etiologia da estomatite por prótese total mostra-se extremamente variável, conceitualmente classificada como uma doença multifatorial, podendo estar associada ao uso da prótese, à microbiota, às condições sistêmicas do hospedeiro e à presença do fungo *C. albicans*. Entre esses fatores, a maioria dos estudos afirma que a presença desse fungo na saliva, na mucosa bucal e/ou na superfície interna da prótese removível representa o principal agente etiológico para essa patologia

(ARENDORF; WALKER, 1987; NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998; BARBEAU et al., 2003; BUDTZ-JORGENSEN, 1970; CEBALLOS; GONZALEZ-MOLES; URQUIA, 1990; FOTOS; HELLSTEIN, 1992; OLSEN, 1974; CAMPOS et al., 2008; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006).

A literatura reporta uma grande variedade de terminologias para se referir a esta doença: estomatite por dentadura ou estomatite protética (CROCKETT; O'GRADY; READE, 1992; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002), candidíase eritematosa (CROCKETT; O'GRADY; READE, 1992), boca irritada por dentadura (BUDTZ-JORGENSEN, 1978), estomatite por dentadura associada à *Candida* (MAZA et al., 2002), estomatite induzida por dentadura (NIKAWA; HAMADA; YAMAMOTO, 1998), candidose oral associada ao uso de dentadura (BUDTZ-JORGENSEN et al., 2000); candidíase atrófica crônica (BUDTZ-JORGENSEN, 1978) e estomatite relacionada à dentadura (BARBEAU et al., 2003). Entretanto, optamos por utilizar o termo estomatite por prótese total por ser o mais utilizado (ARENDORF; WALKER, 1987).

### **1.3 Formação do biofilme sobre a prótese total**

O biofilme microbiano presente nas próteses com base de resina acrílica é considerado um biofilme complexo, formado por leveduras, bactérias e células epiteliais descamativas (SATO et al., 1997). As formas mais comuns de bactérias isoladas de biofilmes presentes nas próteses são os bacilos e os cocos, especialmente as espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (BAENA-MONROY et al., 2005; SATO et al., 1997). Tem sido sugerido que na EP as bactérias possivelmente favorecem a adesão de blastóporos (comensais) às superfícies internas das próteses por coagregação (SATO et al., 1997), o que é ainda mais significativo na presença de dieta rica em carboidratos (NIKAWA, 1997).

À semelhança de outros microorganismos presentes na cavidade bucal, a *C. albicans* possui a habilidade de adesão às resinas das próteses totais, quer seja diretamente ou através de uma camada intermediária formada por placa bacteriana (CHANDRA et al., 2001a).

Após a adesão à superfície, inicia-se o processo de formação do biofilme. Em contraste à vasta descrição dos biofilmes bacterianos, pouca atenção era dada aos biofilmes formados exclusivamente por fungos. Porém, devido às respostas inflamatórias que podem

ocorrer nas mucosas bucais, decorrente do contato com as próteses totais, essa estrutura complexa tornou-se alvo de interesse de diversos autores (CHANDRA et al., 2001 a; CHANDRA; ZHOU; GHANNOUM, 2005; DONLAN; COSTERTON, 2002; HAWSER; DOUGLAS, 1994; KUHN et al., 2002).

Os biofilmes são definidos como uma comunidade sésil caracterizada por células que formam microcolônias e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento microbiano e à transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001; KUHN et al., 2002).

#### **1.4 Fatores relacionados à adesão e penetração da *C. albicans***

Uma vez na boca, bactérias e fungos do biofilme microbiano, dentre elas a *C. albicans* encontram diversos locais de adesão como as células epiteliais da mucosa, da língua, ou as superfícies dos dentes, das próteses fixas e/ou removíveis e de outros microorganismos que já colonizam essas superfícies, promovendo ancoragem para hifas e permitindo seu crescimento através do tecido epitelial (VITKOV et al., 2002).

A adesão desse fungo à superfície de células epiteliais mucosas ou superfícies inertes é um evento primário necessário para a sua colonização e desenvolvimento da patogênese (BURFORD-MASON; WEBER; WILLOUGHBY, 1988; NIKAWA, et al., 1991). Para iniciar a doença, a *C. albicans* deve aderir às células epiteliais da mucosa bucal e, subsequentemente, o fungo invade e destrói essas células (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000).

A *C. albicans* é um patógeno versátil e bem adaptado. O dimorfismo representa a habilidade desse fungo de se desenvolver em diferentes formas morfológicas: leveduras e filamentosas (hifas ou pseudohifas). Essa última forma é a mais virulenta e invasiva devido à capacidade de aderir ao tecido epitelial e penetrar nas células do hospedeiro (HOWLETT; SQUIER, 1980; VITKOV et al., 2002).

## 1.5 Controle do biofilme sobre a prótese total

De acordo com Budtz-Jørgensen (1990), o tratamento para a estomatite protética deveria envolver cuidados com a higiene das próteses, remoção das mesmas da cavidade bucal durante a noite, imersão em clorexidina e terapia antifúngica tópica com nistatina, anfotericina B ou miconazol. A terapia com antifúngico sistêmico (fluconazol) deveria ser indicada apenas para os pacientes com imunossupressão.

Apesar da importância de uma higiene apropriada da prótese total, diversas pesquisas indicam que a maioria da população usuária dessas próteses falha em mantê-las limpas (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; COLLIS; STAFFORD, 1994; HOAD-REDDICK; GRANT; GRIFFITHS, 1990). A efetividade da escovação, isoladamente, não é eficiente (CHAN et al., 1991; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997). Provavelmente a remoção mecânica dos microorganismos pela escovação é dificultada pelas irregularidades e porosidades presentes na resina acrílica (CHAU et al., 1995; DAVENPORT, 1972; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997). Outro fator agravante é que os pacientes idosos frequentemente apresentam capacidade visual reduzida e destreza manual limitada, o que resulta em uma higienização menos eficiente (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; HOAD-REDDICK; GRANT; GRIFFITHS, 1990).

## 1.6 Cianoacrilatos

Os estudos mostram a utilização de polidores líquidos em diversos tipos de restaurações e inclusive em próteses totais, no entanto, além do custo elevado esses materiais possuem algumas limitações, nem sempre apresentando o comportamento desejado e relatado pelo fabricante. Encontrar um material de cobertura apropriado é de grande importância clínica. Portanto, os adesivos a base de cianoacrilato são produtos que poderiam ser testados como polidores líquidos e agir no controle do biofilme.

Os alquil-2-cianoacrilatos foram primeiramente sintetizados em 1949 por Ardis, mas somente em 1959 suas propriedades adesivas foram relatadas por Coover. Os cianoacrilatos são substâncias líquidas (monômeros), de baixa viscosidade, incolores e derivados do ácido cianoacrílico, apresentando a fórmula geral  $\text{CH}_2=\text{CH-COOR}$ , de forma que o R pode

representar um radical metil ( $R=CH_3$ ), etil ( $R=C_2H_5$ ), butil e isobutil ( $R=C_4H_9$ ) e octil-cianoacrilato ( $R=C_8H_{17}$ ) (TORIUMI et al, 1990). Os cianoacrilatos polimerizam em poucos segundos, quando entram em contato com a água, ar e superfícies, tais como: endotélio, mucosa, pele, sangue e osso, degradando-se em cianoacetato e formaldeído, com uma ligeira reação exotérmica. Por serem de forma líquida, possuem a habilidade de penetrar em superfícies irregulares dos tecidos, promovendo uma forte adesão (WEBER; CHAPMAN, 1984).

Os cianoacrilatos têm sido utilizados na medicina e odontologia por vários anos. Têm sido aplicados em suturas (BOCCA et al., 1999; BORBA et al., 2000; COOPER; PAIGE, 2006; NASCIMENTO et al., 1996; SANTOS et al., 1990), capeamentos pulpare (BHASKAR et al., 1972), como material retrobturador para cirurgias endodônticas (AZEVEDO; MARQUES; BOMBANA, 2003; DOURADO ET al., 2005), como materiais adesivos no fechamento de retalhos gengivais, em lacerações mucosas e cutâneas (DOURADO et al., 2005), selamento de canais radiculares, redução da sensibilidade dentinária e do cimento (HEROD,1950) e como coadjuvante do isolamento absoluto. (ARAÚJO et al.,2003; ROAHEN; LENTO,1992)

### **1.7 Técnicas empregadas na análise de biofilmes**

Tradicionalmente, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido o método de escolha para análise dos biofilmes devido à sua alta resolução. Essa técnica permite a observação da presença e da morfologia dos microorganismos, assim como da formação de biofilme e das diferentes associações microbianas na superfície de materiais poliméricos. Além disso, possibilita a análise minuciosa dos microorganismos em biofilmes, como a remoção desses da superfície do material e alterações na sua morfologia. No entanto, essa técnica requer, como pré-requisito, que o biofilme seja submetido aos processos de desidratação e de fixação, portanto, esta não é apropriada para o estudo de características funcionais de microorganismos em biofilmes, como a viabilidade celular (WOOD et al., 2000).

A microscopia de fluorescência tem se revelado um método mais sensível na caracterização da viabilidade de microorganismos. A determinação da viabilidade por meio desta técnica ocorre através do uso de marcadores fluorescentes, denominados fluorocromos,

que possibilitam a avaliação de aspectos funcionais e estruturais das células. O fluoróforo é a parte presente no fluorocromo responsável pela produção de fluorescência. A fluorescência ocorre por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons providos de uma fonte (lâmpada ou feixe laser) e passam de um estado fundamental de energia mais baixa para um estado excitado de energia mais elevada. Nesse estado, o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso, a energia desse estado excitado é dissipada em forma de fóton e o elétron retorna novamente para o estado de menor energia. A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e através dele gerar uma imagem (ALBERTS, 2004).

Entre as técnicas de microscopia de fluorescência, a microscopia confocal de varredura a laser, associada à aplicação de fluorocromos específicos à amostra a ser analisada, proporciona a análise de biofilmes sem o preparo dos espécimes, dispensando procedimentos como a desidratação, a embebição e a fixação (ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001). Desse modo a arquitetura e organização interna do biofilme são mantidas, além de outras características, como a espessura e a viabilidade celular (WOOD et al., 2000). Outra vantagem do microscópio confocal para o estudo do biofilme é a sua capacidade de captar imagens em diferentes profundidades de foco, facilitando a visualização de espécimes irregulares, densos e espessos de maneira tridimensional (KUBINOVA; JANACEK, 2001).

Quanto às técnicas de análise da viabilidade das células fúngicas, a identificação de células viáveis através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) é demorada e não relata com confiança a capacidade metabólica das células apresentando crescimento lento ou no estado de não divisão (MILLARD et al., 1997). Isso é fundamental, visto que diante de alterações ambientais, microorganismos, entre eles a *C. albicans*, podem alterar seu estado fisiológico, interrompendo a divisão celular, mas mantendo suas atividades metabólicas. Por isso, a determinação da viabilidade microbiana deve abranger outros aspectos além da proliferação celular (WEIGER et al., 2002). Métodos de contagem direta, os quais tipicamente envolvem pigmentação vital com indicadores, tais como o azul de metileno ou o sal de tretazolium, são utilizados para acessar a atividade de oxi-redução dos fungos. Embora essa análise seja simples para ser realizada, ela demonstra não ser fidedigna em fungos, devido ao fato de haver inconsistência na retenção dos indicadores nessas células, assim como o fato das superfícies dessas células não serem específicas para esses indicadores (MILLARD et al., 1997)

## 2 OBJETIVOS

Esse trabalho se propôs a avaliar se as modificações realizadas em resina acrílica para reembasamento seriam eficientes na inibição ou redução da formação de biofilme de *Candida albicans* sobre a resina modificada em função de:

- aplicação de uma camada do adesivo etil-cianoacrilato (Super Bonder®) sobre a superfície rugosa da resina acrílica
- incorporação do adesivo Super Bonder® no interior da resina acrílica
- aplicação de uma camada do polidor líquido (Biscover®) sobre a superfície rugosa da resina acrílica.

Para essa análise foi utilizada a microscopia confocal de varredura a laser.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Confeção dos corpos de prova

Antes de explicar a maneira como os corpos de prova foram realizados, é importante elucidar a diferença nos grupos estudados. Ao todo foram realizados 7 grupos, cada um contendo 8 corpos de prova (n=8). O grupo controle constituiu de corpos de prova sem qualquer tipo de tratamento. Os grupos experimentais receberam a aplicação de uma camada de Super Bonder®(Loctite, Henkel, Brasil), um adesivo a base de etil-cianoacrilato ou de Biscover®(Bico, USA) em sua superfície rugosa. Esses grupos foram divididos da seguinte maneira: Para cada material testado, um grupo recebeu a camada do material de cobertura antes da esterilização e o outro grupo após. Baseado em um estudo piloto anterior, existiram ainda os grupos que receberam tratamento através da incorporação da Super Bonder® na resina acrílica, variando a quantidade de três e quatro gotas. Dessa maneira, os grupos foram assim divididos (Figura1).

- Grupo 1- controle/G1(C)
- Grupo 2- Super Bonder® pincelada na superfície antes da esterilização/ G2(SBAE)
- Grupo 3- Super Bonder® pincelada na superfície depois da esterilização/G3(SBDE)
- Grupo 4- 3 gotas de Super Bonder® incorporadas na resina/G4(SB3G)
- Grupo 5- 4 gotas de Super Bonder® incorporadas na resina/G5(SB4G)
- Grupo 6- Biscover® pincelado na superfície depois de esterilizar/G6(BCDE)
- Grupo 7- Biscover® pincelado na superfície antes de esterilizar/G7(BCAE)

**Figura 1-** Distribuição dos grupos de acordo com a modificação realizada na resina acrílica

Para confecção dos corpos de prova foi utilizada uma matriz metálica de forma retangular, medindo 30 x 5 x 5mm. Cada matriz, previamente vaselinada, foi preenchida com a resina acrílica rosa autopolimerizável para reembasamento New Truliner (Bosworth Company, USA), homogeneizada com o auxílio de uma espátula n° 31 (SS White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. E Comércio de

produtos odontológicos, Florianópolis, SC), utilizando-se a proporção recomendada pelo fabricante. Vale ressaltar que, para os corpos de prova que tiveram a Super Bonder® incorporada no interior da sua resina, essa incorporação ocorreu no momento da manipulação pó-líquido, variando a quantidade de 3 e 4 gotas. A resina acrílica foi inserida no interior da matriz metálica na fase plástica e prensada entre duas placas de vidro (JON Com de produtos odontológicos LTDA, São Paulo, SP) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. E Ind. Farmacêutica LTDA, São Gonçalo, RJ), sob peso de 5 Kg, por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, o corpo de prova foi removido da matriz e os excessos foram retirados com o auxílio de uma fresa de tungstênio (Edenta AG, Switzerland). As etapas citadas acima estão ilustradas a seguir na Figura 2.



**Figura 2: Confeção dos corpos de prova.** Matriz metálica utilizada (A). Resina acrílica para reembasamento (New Truliner) (B). Preenchimento da matriz com a resina (C).

### **3.2 Lixamento dos bastões de resina acrílica, seccionamento, avaliação da rugosidade superficial e esterilização dos corpos de prova**

Cada bastão de resina acrílica teve uma face escolhida, na qual foi realizado um lixamento manual em forma de oito (VERRAN; MARYAN, 1997), por 30 segundos, por meio de lixa d'água na granulação 120 (Norton Abrasivos, São Paulo, SP, Brasil), em baixa velocidade, sob refrigeração em uma politriz circular (Dp-10, Struers-Panambra, São. Paulo, SP, Brasil), em baixa velocidade, sob refrigeração.

Durante os ensaios iniciais dessa pesquisa foram realizadas leituras, por meio de rugosímetro, na superfície mais crítica para higienização das próteses totais, a superfície interna. Os valores oscilaram entre 1 e 2  $\mu\text{m}$ . Baseado nisso, essa mesma média de rugosidade superficial foi determinada na face lixada dos bastões de resina, sendo mensurada através do aparelho rugosímetro Hommel Tester T 1000 basic (Hommelwerke GmbH, ref. # 249851, Schwenningen, Germany). A leitura considerada foi a média aritmética ( $R_a$ ) entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho, onde o percurso de medição foi de 4.8 mm,

comprimento de onda limite 0.8 mm e velocidade de 0.5mm/s. Foram efetuadas 6 leituras na superfície lixada de cada bastão de resina acrílica (RAHAL et al., 2004).

Cada bastão de resina acrílica foi cortado ao meio, por meio de um disco diamantado (Extec dia. wafer blade 4"x 0.12 x ½ high concen., Erios, São Paulo, SP-Brasil), dando origem aos corpos de prova propriamente ditos, medindo 15 x 5 x 5 mm. Ao final, foram obtidos 56 corpos de prova.

Todos os grupos foram submetidos a um ciclo adicional de polimerização a 100°C por 2 horas na polimerizadora microprocessada digital, modelo Banho Maria (Solab, Piracicaba, SP) para remoção de monômero residual (SHIM; WATTS, 1999). Em seguida os corpos de prova foram submetidos à limpeza em ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Arotec, Odontobrás, São Paulo, Brasil) por 20 minutos (PEREIRA-CENCI et al., 2007) em água destilada para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina. Posteriormente os corpos de prova foram deixados em ar livre para sua secagem.

Em seguida, os corpos de prova dos grupos G2(SBAE) e G7(BCAE) receberam a camada de Super Bonder® e de Bicober® antes de serem enviados para a esterilização e os dos grupos G3(SBDE) e G6(BCDE) receberam essa camada após voltarem do procedimento de esterilização. A camada de Super Bonder® foi aplicada com o auxílio de um pincel de pelo de marta (Condor, nº 456, Condor S.A., ao Bento do ul, SC) na face rugosa do corpo de prova e foram esperados 5 minutos para a completa secagem do material. Para a aplicação da camada de Bicober®, também foi utilizado o mesmo tipo de pincel e uma fina camada do material foi aplicada na face rugosa do corpo de prova e polimerizada com um fotopolimerizador com fonte de luz halógena com comprimento de onda de 500mW/cm<sup>2</sup> durante 15 segundos.

Todos os corpos de prova foram então enviados, embalados por grupos, para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil-Central de esterilização comércio e indústria, Campinas, SP) (SILVA et al., 2006; MIMA et al., 2008). As etapas acima citadas estão ilustradas a seguir na Figura 3.



**Figura 3:** Lixamento dos corpos de prova na poltriz. (A) Corpo de prova após lixado com sua superfície rugosa identificada e voltada para cima. (B) Polidor líquido Biscover® (C) Adesivo Super Bonder® (D) Corpo de prova após voltar da esterilização (E)

### 3.3 Inoculação dos corpos de prova

#### 3.3.1 Preparo do inóculo de *C. albicans*

##### 3.3.1.1 Obtenção da pré cultura

Todos os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Centro Integrado de Pesquisa-1 (CIP-1) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, sempre em condições assépticas, em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70°.

Foi utilizada a cepa de *C. albicans* selvagem SC5314 (GILLUM et al., 1984), cedida pelo Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo. O preparo do inóculo foi feito da seguinte maneira: as células foram mantidas a -80°C em solução contendo 20% de glicerol e semeadas em placas contendo meio de cultura YPD (por litro: 10g yeast extract, 10g peptone, 20g glucose [dextrose], 20g Bacto Agar) incubadas a 30°C durante 36 horas em estufa.

Uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50mL de meio de cultura YPD e mantida em incubadora (Nova Ética) a 30°C, sob agitação de 180rpm overnight (aproximadamente 16 horas).

### 3.3.1.2 Purificação das células fúngicas

Foram retirados 5mL da cultura e colocados em tubos Falcon de 15 mL para centrifugação a 4000rpm por 5 minutos (Eppendorf do Brasil Ltda); em seguida, o sobrenadante foi descartado.

A purificação das células foi feita através de lavagem do pellet com PBS (5 mL), e homogeneização em vórtex seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

### 3.3.1.3 Contagem da concentração do inóculo

O pellet final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuscitado em 1mL de PBS e diluído 1:10000. Uma alíquota da diluição foi colocada em câmara de Newbouer para contagem das leveduras em microscópio óptico comum (BIZERRA et al., 2008).

Depois de obtida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS para aquisição de inóculo em concentração de  $1,0 \times 10^7$  células/mL (CHANDRA et al., 2001 b).

## 3.4 Formação do biofilme

Vale ressaltar que antes da realização dessa etapa, os corpos de prova dos grupos G3(SBDE) e G6(BCDE) receberam a camada de Super Bonder® e de Biscover® na superfície rugosa de seus corpos de prova, com todo o procedimento realizado no interior de uma capela de fluxo laminar. Utilizando uma pinça estéril (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ), cada corpo de prova foi colocado em um poço de uma placa de cultura de tecidos de 24 poços (TPP, Switzerland), no qual foi dispensado 3mL do inóculo de *C. albicans* com concentração de  $1,0 \times 10^7$  células/mL, através de pipetas de precisão e ponteiros descartáveis, deixando os corpos de prova totalmente submersos e com sua face rugosa voltada para cima. O tempo de adesão foi de 90 minutos à temperatura de 37°C, sob agitação de 75 rpm, em incubadora (CHANDRA et al., 2001b). Após esse período, as células que não aderiram ao substrato foram removidas através de lavagem individual de cada corpo de prova, imergindo suavemente cada um em 3mL de PBS (HAWSER; DOUGLAS, 1994; KUHN et

al., 2002). Na sequência, os corpos de prova foram submersos em 3mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e incubados a 37°C sob agitação de 75 rpm, para crescimento do biofilme (BIZERRA et al., 2008).

### **3.5 Análise dos corpos de prova através de microscopia confocal.**

A análise dos corpos de prova utilizados nesse estudo foi realizado através do microscópio confocal Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany).

#### **3.5.1 Processamento dos corpos de prova para a microscopia confocal**

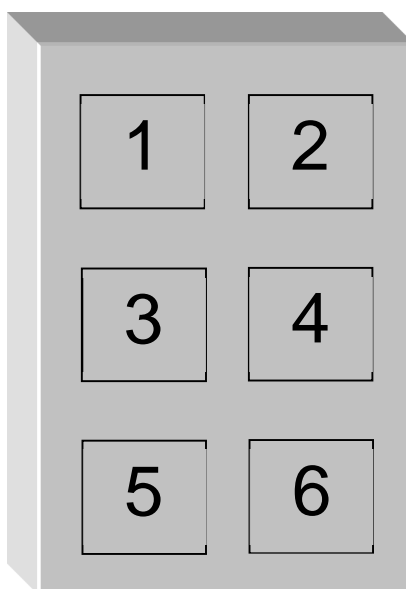
Como a análise no microscópio confocal não permite a análise de mais de um corpo de prova por vez, cada corpo de prova foi processado de forma individual.

Previamente à análise em microscópio confocal, cada corpo de prova foi suavemente imerso em 3 mL de PBS contido no poço da placa de cultura para remoção das células não aderidas. Assim, concluída a lavagem em PBS, cada corpo de prova foi transferido para um poço da placa de cultura de tecidos de 24 poços, contendo 1 mL de PBS, misturado com 1 µl do fluorocromo SYTO-9 (Molecular Probes, Invitrogen Brasil Ltd., São Paulo, SP) e 1 µl do fluorocromo iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As concentrações dos fluorocromos foram ajustadas durante os ensaios piloto, de maneira a proporcionar um melhor contraste entre as células fúngicas e a resina acrílica. Na sequência, foram aguardados 20 minutos para que houvesse a difusão dos fluorocromos no biofilme (JIN et al., 2005). Esse procedimento foi realizado na ausência de luz a 37°C, de acordo com as orientações do fabricante.

Imediatamente após o período de incubação, cada corpo de prova foi cuidadosamente montado em lamínula de vidro associada a óleo de imersão, com a face rugosa para baixo, para análise do biofilme em microscópio confocal Leica TCS-SPE. A objetiva usada foi uma lente de imersão em óleo (40x; abertura numérica de 1,15).

### 3.5.2 Análise dos corpos de prova no microscópio confocal

A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada em 6 diferentes campos (SMITH; HUNTER, 2008), de acordo com a figura abaixo, a fim de que não houvesse a possibilidade de análise de um mesmo campo repetidas vezes.



**Figura 4:** Seqüência padrão de análise dos 6 campos dos corpos-de-prova no microscópio

Para a análise das células do biofilme de cada campo, foi realizada a tomada de uma série de secções ópticas horizontais, com 1µm de intervalo, por toda a profundidade do biofilme. De cada secção foram adquiridas duas imagens, de forma seqüencial. Para o SYTO-9 foi utilizada a excitação em 488 nm, e o detector espectral foi programado para a faixa de 495 a 575 nm. Para o Iodeto de Propídeo, a excitação foi em 532 nm, e a detecção entre 595 e 730 nm. A aquisição seqüencial elimina qualquer interferência que possa existir do fluorocromo verde sobre o vermelho (*cross-talk*). O programa utilizado para a aquisição das imagens foi o Leica LAS AF (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany). Posteriormente, também através desse programa, foi realizada a união das duas imagens de cada secção, assim como o agrupamento de todas as secções de cada campo, gerando uma imagem final.

As células viáveis, sem comprometimento de membrana citoplasmática, apresentaram coloração verde, indicando que somente o SYTO-9 estava presente no seu interior. As células

não viáveis, com comprometimento de membrana citoplasmática celular, apresentaram coloração amarelo-avermelhada, indicativa da presença do SYTO-9 e do Iodeto de Propídeo no seu interior.



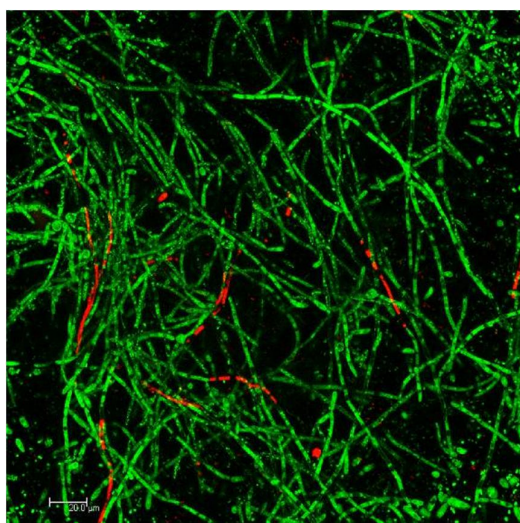
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise qualitativa do efeito da Super Bonder® e do Biscover® sobre o acúmulo de biofilme em resina acrílica autopolimerizável para reembasamento (New Truliner) através da microscopia confocal

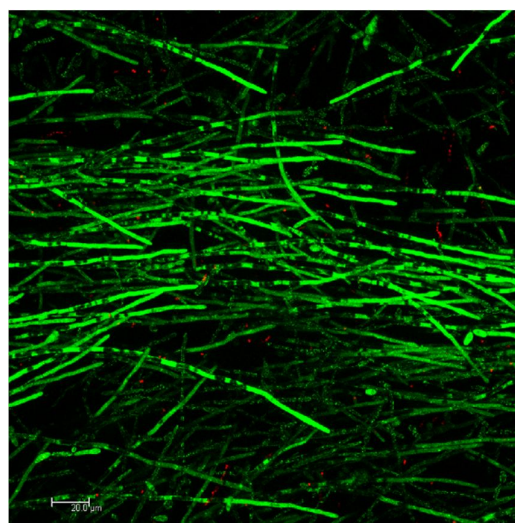
Foram utilizados 8 corpos de prova de cada grupo para a análise do efeito da Super Bonder® e do Biscover® sobre o acúmulo de biofilme em resina acrílica autopolimerizável para reembasamento (New Truliner) através da microscopia confocal. De cada corpo de prova foram adquiridas 6 imagens de diferentes campos do biofilme, totalizando 48 campos para cada grupo.

A análise através do microscópio confocal mostrou a presença de um elevado número de *C. albicans* sobre a resina acrílica autopolimerizável, exceto para os grupos 2 e 3. Na maioria dos campos analisados, as células fúngicas remanescentes se apresentaram aglomeradas na forma tubular ou filamentosa, típica de hifa. Nos grupos 2 e 3 houve a predominância de células na forma de leveduras. As imagens abaixo ilustram os achados obtidos (4.1.1-4.1.7) Figuras 6-19.

#### 4.1.1 Controle / G1(C)

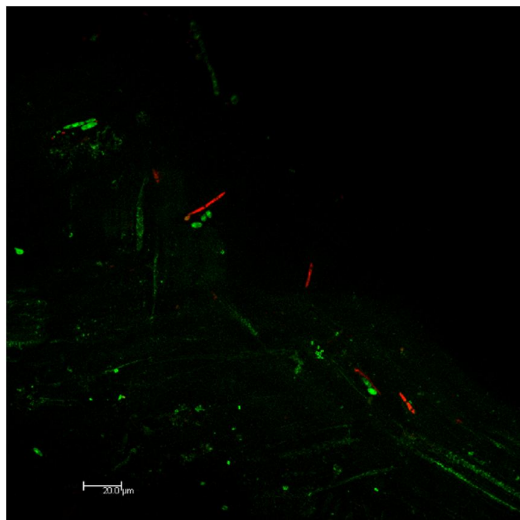


**Figura 6-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 1

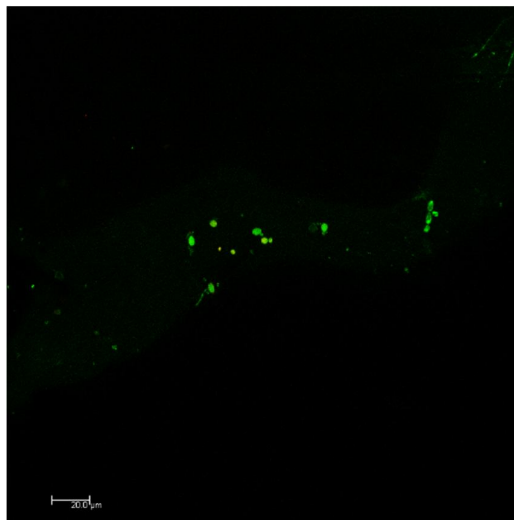


**Figura 7-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 1.

#### 4.1.2 Super Bonder® pincelada na superfície antes da esterilização dos corpos de prova / G2 (SBAE)

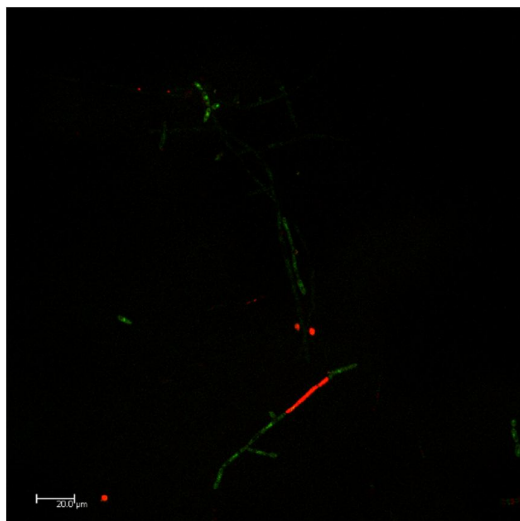


**Figura 8-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 2.

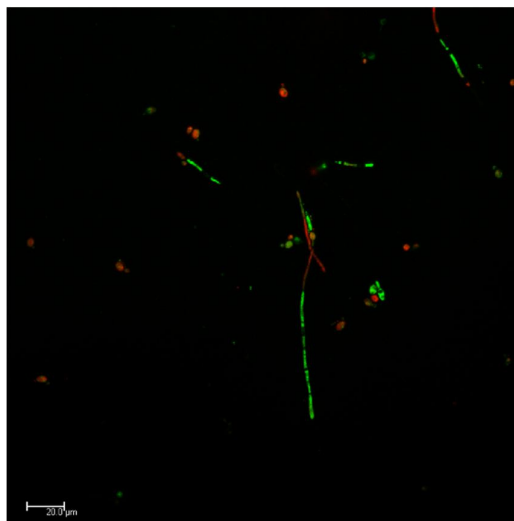


**Figura 9-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 2.

#### 4.1.3 Super Bonder® pincelada na superfície depois da esterilização dos corpos de prova / G3(SBDE)

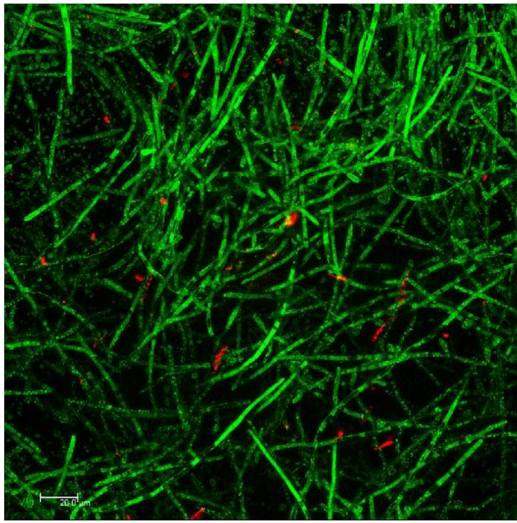


**Figura 10-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 3.

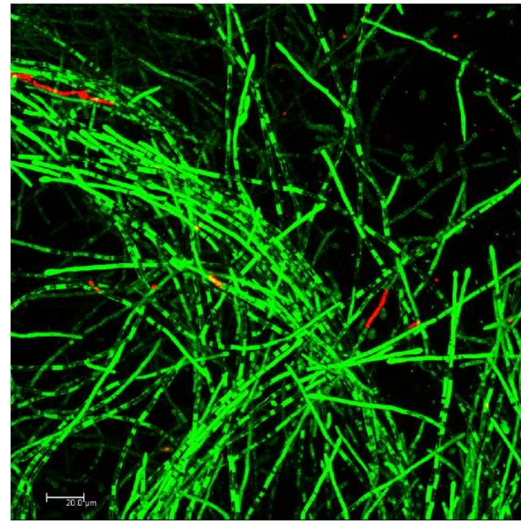


**Figura 11-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 3

#### 4.1.4 3 Gotas de Super Bonder® incorporadas na resina / G4(SB3G)

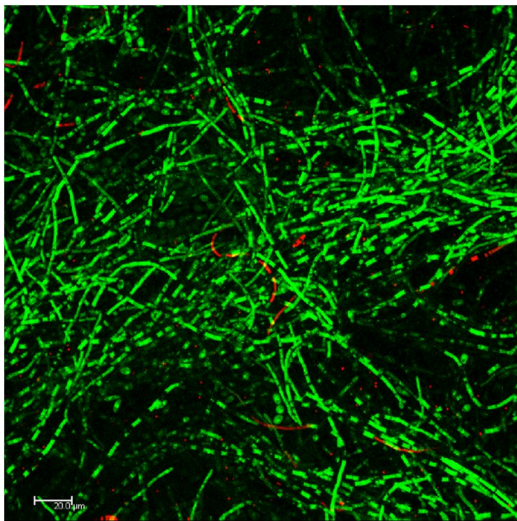


**Figura 12-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 4.

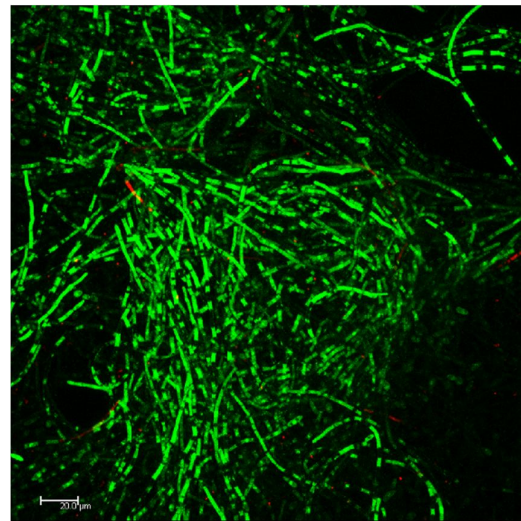


**Figura 13-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 4.

#### 4.1.5 4 Gotas de Super Bonder® incorporadas na resina / G5(SB4G)

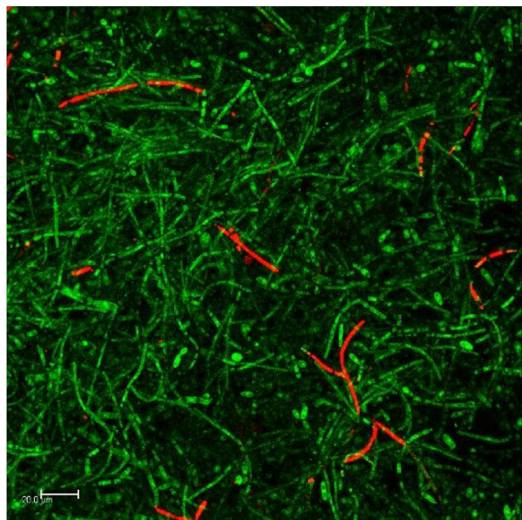


**Figura 14-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 5.

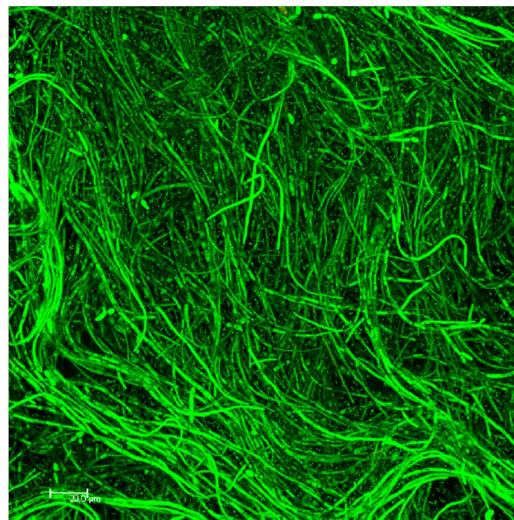


**Figura 15-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 5.

#### 4.1.6 Biscover® pincelado na superfície após a esterilização dos corpos de prova / G6(BCDE)

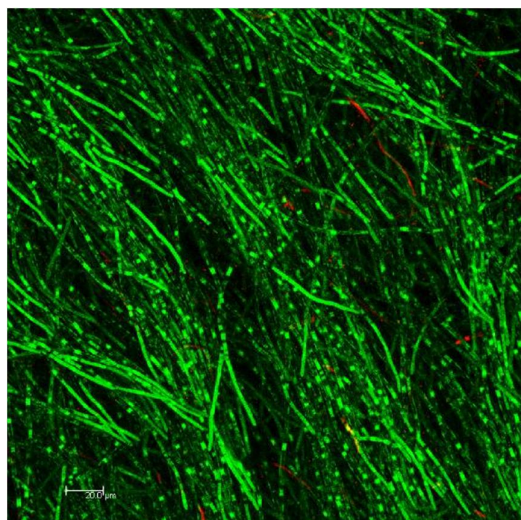


**Figura 16-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 6.

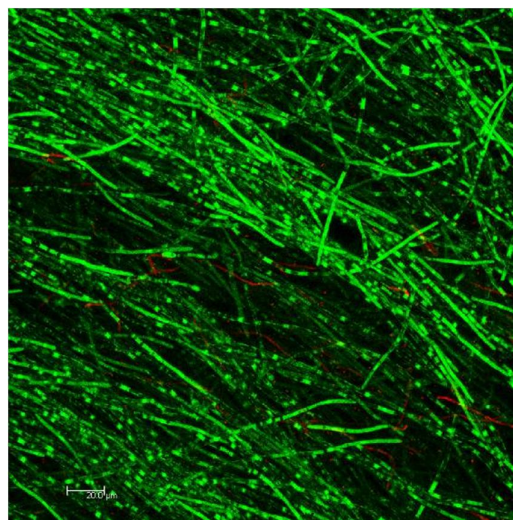


**Figura 17-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 6.

#### 4.1.7 Biscover® pincelado na superfície antes da esterilização dos corpos de prova / G7(BCAE)



**Figura 18-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 7.



**Figura 19-** Sobreposição das imagens de um campo do grupo 7.

## 5 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi identificar as modificações realizadas na resina acrílica utilizada que podem prevenir ou reduzir a formação de biofilme de *Candida albicans* na sua superfície. De acordo com Chandra et al. (2005) uma abordagem para prevenir ou reduzir a formação de biofilme em biomateriais é modificar a química de suas superfícies através da alteração da composição química dos substratos. Dentro deste contexto, alguns autores relatam propriedades antimicrobianas para os adesivos à base de cianoacrilato (HUNTER, 1976; PALMIERI, 1994; KIMAIID, 2000; BLUM, 1975; HOWEL, 1995; HOWELL et al., 1995; SHAPIRO; DINSMORE; NORTH, 2001). Tendo em vista a capacidade antimicrobiana deste produto, optou-se pela utilização da Super Bonder® tanto pincelada na superfície do corpo de prova quanto incorporada na resina acrílica. A quantidade de adesivo incorporado à resina foi decidido após a confecção de um estudo piloto onde, por meio do microscópio confocal a laser, concluiu-se que a incorporação de 1 gota e 2 gotas do adesivo não exercia influência sobre a formação do biofilme. A escolha de utilizar o polidor líquido Biscove® teve como objetivo comparar a Super Bonder® com um produto disponível comercialmente e recomendado pelo fabricante para polimento líquido de resina acrílica.

Foi observado que para os grupos tratados com a Super Bonder® e o Biscove® pincelados em sua superfície, o fato de esses produtos terem sido aplicados antes ou após a esterilização dos corpos de prova não promoveu nenhuma diferença entre os grupos de mesmo tratamento, ou seja, o G2 (SBAE) foi semelhante ao G3 (SBDE) e o G6 (BCDE) foi semelhante ao G7(BCAE), mostrando que o processo de esterilização não promoveu alterações na camada do produto aplicado na superfície da resina acrílica. Quando os corpos de prova foram enviados para a esterilização, houve um período de 15 dias entre o envio e o recebimento dos mesmos esterilizados. Ou seja, mesmo passado esse tempo, os produtos aplicados nos grupos antes da esterilização não perderam a sua efetividade, o que não está de acordo com os estudos de Howell et al. (1995) e Shapiro, Dinsmore e North (2001) que mostraram que o 2-octil-cianoacrilato é efetivo como uma barreira antimicrobiana durante as primeiras 72 horas após a aplicação.

Foi observado que, de todos os corpos de prova modificados, os que receberam a Super Bonder® em sua superfície, G2(SBAE) e G3(SBDE) foram os únicos que significativamente reduziram a formação de biofilme de *Candida albicans*. Os mecanismos que envolvem a incapacidade da *C. albicans* em formar biofilme nos corpos de prova que

receberam esse adesivo são desconhecidos. De acordo com Pereira-Cenci et al. (2008) há evidências de que as espécies de *Candida* são capazes de aderir às resinas acrílicas das próteses, o que é considerado como o primeiro passo no processo de infecção. Essa aderência está diretamente relacionada às propriedades superficiais do substrato polimérico como energia livre de superfície, hidrofobicidade e rugosidade. A energia livre de superfície tem sido considerada um dos principais fatores relacionados à estomatite protética, sendo definida como a interação entre as forças de coesão e de adesão. Quanto maior a energia livre de superfície, maior a adesão celular. Quanto maior a hidrofobicidade dos microorganismos maior é a aderência às resinas acrílicas. A rugosidade superficial determina diretamente a aderência inicial do microorganismo, o desenvolvimento do biofilme e a colonização microbiana. Superfícies mais rugosas geralmente apresentam maior número de células, pois podem servir como um reservatório microbiano, aumentando a retenção do biofilme e sua resistência às forças de cisalhamento da escovação. Como não foi o objetivo desse estudo, essas propriedades inerentes ao substrato não foram avaliadas, no entanto, não se pode descartar a possibilidade de a camada de Super Bonder® ter alterado alguma(s) dessas propriedades e por isso ter alterado a adesão das células fúngicas ao substrato. Como consequência, essas células não aderiram fortemente à camada de Super Bonder® e foram provavelmente desprendidas durante as manipulações realizadas para a análise no microscópio confocal.

Somado a isso, alguns autores relatam propriedades antimicrobianas para os adesivos a base de cianoacrilato (HUNTER, 1976; PALMIERI, 1994; KIMAIID, 2000; BLUM, 1975; HOWEL, 1995; HOWELL et al., 1995; SHAPIRO; DINSMORE; NORTH, 2001), o que poderia explicar esse comportamento favorável da Super Bonder®. Palmieri (1994) gotejou a cola de etil-cianoacrilato diretamente sobre placas com ágar sangue previamente semeadas com *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*: a inibição do crescimento bacteriano foi observada após 24 horas. Kimaid et al. (2000) afirmaram que em todos os períodos de observação da pesquisa, na qual foi utilizado o etil-cianoacrilato, não foi observado qualquer sinal de infecção bacteriana. Diante disso os autores acreditam que o etil-cianoacrilato também poderia possuir alguma propriedade antimicrobiana, uma vez que se tem descrito na literatura que o monômero dos cianoacrilatos apresenta uma forte propriedade bactericida (HUNTER,1976). Essa possível propriedade antimicrobiana dos cianoacrilatos pode ser a explicação para o reduzido número de células fúngicas na forma de hifa (patogênica) para os

grupos que receberam a Super Bonder® em sua superfície, já que a maioria das células se apresentaram na forma de levedura (inócua).

Os grupos que receberam a Super Bonder® incorporada na resina acrílica, G4(SB3G) e G5(SB4G), não se comportaram de maneira tão favorável quanto os grupos G2(SBAE) e G3(SBDE), que tiveram o adesivo como cobertura do substrato. Provavelmente, o aprisionamento das moléculas do etil-cianocrilato, quando misturado à resina, impediu seu efeito sobre a adesão microbiana, tal como foi visto quando o adesivo Super Bonder® foi pincelado. Alguns estudos estão de acordo com esses resultados, pois avaliaram substâncias que possuíam efeito de inibição contra a *C. albicans* e a partir do momento em que foram incorporadas à resina acrílica perderam o seu efeito. Thomas e Nutt (1978) estudaram o efeito *in vitro* do condicionador de tecido Visco-gel modificado pela incorporação de nistatina ou anfotericina B sobre o crescimento de *C. albicans*, *C. Krusei* e *C. tropicalis*. Os resultados mostraram que a anfotericina B tornou-se ineficaz quando misturada ao Visco-gel, mas quando utilizada isoladamente permaneceu ativa na inibição do crescimento fúngico. O trabalho de Quinn (1985) estudou o efeito da associação de miconazol (Daktarin) e cetoconazol (Nizoral) a três condicionadores teciduais (Ivoseal, Viscogel e Fitt) na inibição do crescimento de *C. albicans*. Como parâmetro para comparação, foi utilizada a incorporação de nistatina e anfotericina B aos materiais resilientes. Os resultados obtidos comprovaram a ineficácia da anfotericina B como agente antifúngico quando incorporada a materiais resilientes. Cada produto incorporado à resina possui seu próprio nível de liberação, o qual é afetado de forma significativa por sua absorção e distribuição no interior do material polimérico (JENQUIN et al., 1990; BROOK; VAN NOORT, 1985). Brook e Van Noort (1985) relataram que a liberação do produto incorporado na resina acrílica é dependente da fragilidade da matriz polimérica, da quantidade do produto e da porosidade do material. Outras pesquisas com quantidades maiores do adesivo incorporado à resina poderiam ser realizadas com o objetivo de verificar se uma maior concentração do adesivo poderia exercer um maior controle sobre a formação do biofilme.

Os resultados desfavoráveis encontrados para o Biscover® não estão de acordo com o estudo de Budtz-Jorgensen e Kaaber (1986), os quais estudaram *in vivo* um sistema de polimento líquido aplicado nas superfícies internas das próteses totais e observaram uma diminuição no acúmulo de biofilme nessas superfícies durante a primeira semana de utilização. Davidi et al. (2007) também mostraram que a formação de biofilme *in vivo* em restaurações provisórias de polimetil metacrilato (PMMA) foi significativamente reduzida

quando cobertas com adesivo resinoso. Além disso, o uso da resina para polimento líquido Biscover® como o agente de cobertura preveniu a formação de biofilme nessas restaurações. Já os achados de Sesma et al. (2005) estão de acordo com esse estudo. Os autores avaliaram *in vivo* a eficácia do polidor líquido fotopolimerizável Palaseal®, (Heraeus / Kulzer, Wehrheim, Germany) em modificar a colonização de placa das dentaduras. Os achados desse experimento clínico mostraram que o polimento líquido da superfície interna da dentadura não preveniu a colonização fúngica.

É interessante discutir o comportamento do Biscover® nesse estudo, pois, além de não ter conseguido controlar a formação de biofilme sobre o substrato, quando o parâmetro avaliado foi a cobertura do substrato, esse produto foi mais desfavorável do que a resina acrílica sem tratamento. O fabricante afirma que o Biscover® é uma resina fluida e que a camada formada como resultado de sua aplicação é fina. Por um lado, o desejável é uma camada fina do polidor líquido, já que uma camada mais espessa poderia levar a uma desadaptação da prótese. Por outro lado, uma camada muito fina pode ter dificuldade de preencher as irregularidades ou defeitos da superfície interna da prótese total. Esse problema pode ter acontecido nesse estudo, já que previamente à aplicação do Biscover®, os corpos de prova foram lixados e talvez, por ser muito fluido, esse produto não foi capaz de compensar as irregularidades criadas na superfície da resina acrílica, favorecendo a adesão das células de *Candida albicans*, já que é sabido que a rugosidade superficial é um fator diretamente ligado ao acúmulo de biofilme. Alguns autores também têm mostrado que os polidores líquidos não são capazes de compensar todas as irregularidades de superfície. (ROEDER, 2000; DOS SANTOS et al., 2007; DICKINSON; LEINFELDER, 1990). Zimmerli et al. (2011), constataram que dos polidores líquidos utilizados em seu estudo, o Biscover® e o Lasting Touch® não foram capazes de compensar todas as irregularidades do corpo de prova, então eles concluíram que quando esses dois polidores líquidos fossem aplicados, seria recomendável realizar previamente um polimento mecânico refinado. No entanto, para prótese total esse procedimento seria inviável, já que não se pode realizar um polimento mecânico da superfície interna da prótese, pois o mesmo causaria uma desadaptação da mesma, ou seja, parece ser sensato afirmar que o Biscover® não é muito indicado para polimento líquido de próteses totais, já que para sua eficácia, às vezes se faz necessário um polimento mecânico prévio.

Outra hipótese é que o fabricante afirma que o Biscover® pertence a uma nova geração de polidores líquidos que, diferentemente da geração antiga, não apresenta uma



camada pegajosa inibida pelo ar após a sua polimerização. No entanto, tal fato pode ter ocorrido e isso poderia favorecer o acúmulo de biofilme, explicando os resultados obtidos nesse estudo. O estudo de Guler et al. (2009) indicou que o uso desse sistema de polimento pareceu aumentar a pigmentação dos espécimes e sugere que isso pode ter acontecido devido à camada pegajosa inibida pelo ar.

É provável que o mecanismo(s) responsável pela inibição da capacidade da *C. albicans* de formar um biofilme intacto nos corpos de prova que receberam a Super Bonder® na superfície seja multifatorial e mostra a necessidade de outras pesquisas, além desse estudo. É possível que essa inibição seja mediada pela prevenção da adesão da *Candida* à superfície do substrato. O estudo da capacidade que a Super Bonder® tem de controlar a formação de biofilme é necessário. Os resultados relatados nesse estudo podem ter implicações clínicas importantes no planejamento de novos materiais que possuem propriedades antibiofilme.

A formação do biofilme é um processo de infecção multifatorial, o qual é também influenciado pelas propriedades físico-químicas da superfície do substrato. (BLOSSEY, 2003). Tem sido relatado que uma superhidrofobicidade e uma superhidrofilicidade das superfícies são propriedades chave para a fabricação de superfícies autolimpantes (HASSEL et al., 2007).

Nos recentes anos, novas superfícies com propriedades autolimpantes têm gerado imenso interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos materiais. De fato, se superfícies com propriedades controladas pudessem ser fabricadas, então a busca por superfícies livres de contaminação poderiam se tornar uma realidade há tanto tempo esperada (BLOSSEY, 2003).

O desenvolvimento de materiais dentários que possuem uma propriedade de superfície autolimpante poderia trazer uma mudança dramática para o campo da odontologia clínica. Por exemplo, tais materiais de cobertura de superfície, quando utilizados em materiais restauradores, materiais para bases de dentaduras e implantes, poderiam aumentar a longevidade dos mesmos por causa da proteção contra o ataque de microorganismos. Contudo, até o momento, um material dentário com tal propriedade desejável e benéfica ainda não está disponível (BLOSSEY, 2003).

Ainda é precipitada a indicação da utilização da Super Bonder® como polidor líquido para aplicações clínicas em próteses totais. No entanto, esse estudo foi o primeiro passo para o desenvolvimento de um novo material de cobertura com a noção de propriedade de superfície autolimpante em odontologia. Posteriormente, outros estudos *in vitro* deveriam ser realizados

para melhorar as propriedades e durabilidade do material e elucidar o comportamento da Super Bonder® frente ao desenvolvimento de biofilmes utilizando diversas espécies de bactérias e fungos.

Os dados desse estudo demonstraram que as modificações de superfície desses materiais com a Super Bonder® aplicada na superfície podem ser uma abordagem potencialmente útil para reduzir ou controlar a formação do biofilme em próteses totais.

## 6 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia empregada e as limitações desse estudo *in vitro* foi possível concluir que:

- A aplicação da camada de Super Bonder® na superfície rugosa da resina acrílica foi capaz de reduzir de maneira significativa a formação de biofilme de *Candida albicans*.
- As modificações da resina acrílica através da aplicação superficial do Biscover® e da incorporação da Super Bonder® na sua estrutura não ofereceram vantagens em relação ao grupo controle, que não recebeu tratamento.
- O polidor líquido Biscover® não se comportou da maneira esperada, já que não alcançou o objetivo para o qual foi desenvolvido, que é justamente tornar a superfície coberta por ele menos propícia para o desenvolvimento de biofilme.
- Não houve diferença quanto ao tempo de aplicação da Super Bonder® e sua eficiência, já que os corpos de prova que receberam o produto antes da esterilização se comportaram de maneira semelhante aos que receberam o produto depois de esterilizados.

## REFERÊNCIAS

- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922):455-9.
- Alberts B. *Biologia molecular da célula*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Albuquerque DS, Gominho LF, Santos RA. Histologic evaluation of pulpotomy performed with ethyl-cyanoacrylate and calcium hydroxide. *Braz Oral Res*. 2006; 20(3):226-30.
- Araújo GG, Cavada LCM, Machado IG, Roth MGM, Formolo E. Avaliação da genotoxicidade do etil-cianoacrilato, quando usado junto ao isolamento absoluto, através do teste do micronúcleo: um estudo in vivo. *RPG:ver Pós-Grad*. 2003;10:141-7.
- Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979;147(10):267-72.
- Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987;14(3): 217-27.
- Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. *Nurs Times*. 2003;99(48):52-3.
- Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials. An *in vitro* analysis. *Pesquis Odontol Bras*. 2003;17(2):113-8.
- Bady S, Wongworawat M. Effectiveness of antimicrobial incise drapes versus cyanoacrylate barrier preparations for surgical sites. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467:1674-1677.
- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10 Suppl 1:E27-39.
- Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001;21(1):4-8.
- Baptista RRC. Los cianoacrilatos em cirurgia. *Ver Sanid Milit Mex*. 1995;49(3):55-58.

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalond B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(1):51-9.

Barbosa VT. Emprego do etil-cianoacrilato ou do octil-cianoacrilato no preenchimento de lesões corneais, após ceratectomia lamelar em coelhos [dissertação]. Jaboticabal (SP): Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP;2007.

Barbosa RPS, Santos RL, Gusmão ES. Terapias para controle de lesões não cariosas hipersensíveis. *Odontologia.Clín.-Científ.*2005;4(3):171-6.

Barghi N, Alexander C. A new surface sealant for polishing composite resin restorations. *Compend Contin Educ Dent.*2003;24:30.

Barkhordar RA, Javid B, Abbasi J, Watanabe LG. Cyanoacrylate as a retrofilling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65(4):468-73.

Barnabe W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil* 2004;31(5):453-9.

Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent.* 1998;79(4):454-8.

Beech DR. Bonding of alkyl 2-cyanoacrylates to human dentin and enamel. *J Dent Res.* 1972;51(5):1438-42.

Bertrand MF, Leforestier E, Muller M, Lupi-Pégurier L, Bolla M. Effect of surface penetrating sealant on surface texture and microhardness of composite resins. *J Biomed Mater Res.* 2000; 53:658–663.

Bhaskar SN. Effect of butyl cyanoacrylate on the healing of extraction wounds. *Oral Surg.Oral Med. Oral Pathol.* 1967;24:604-16.

Bhaskar SN, Beasley JD, Ward JP, Cutright DE. Human pulp capping with isobutyl cyanoacrylate. *J Dent Res.* 1972;51(1):58-61.

Bhaskar SN, Jacoway JR, Margetis PM, Leonard F, Pani KC. Oral tissue response to chemical adhesives (cyanoacrylates). *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* 1966;22(3):394-404.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TL, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger Ma, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm

formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 008;8(3):442-50.

Blossey R. Self-cleaning surfaces -virtual realities. *Nat Mater.* 2003; 2: 301-306.

Blum GN, Nolte NA, Robertson P. In vitro determination of the antimicrobial properties of two cyanoacrylate preparations. *J Dent Res.* 1975;54:500-3.

Bocca M, Coscia D, Bottalico L, Delpiano IM. New suture techniques in oral surgery. Description and comparison with traditional sutures. *Minerva Stomatol.* 1999;48(12):633-7.

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;13(4):258-69.

Borges APB, Sampaio R, Pompermayer LG, Oliveira H, Rezende CMF, Santos BM. Emprego de adesivo butil-2-cianoacrilato na fixação de esquirolas em fraturas de fêmur de cães. Aspectos radiológicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 1992;44:29-41.

Brook IM, Van Noort R. Controlled delivery of drugs. A review of polymer-based devices. *Br Dent J.* 1984;157(1):11-5.

Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis.3. Histopathology of trauma-and-candida-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odontol Scand.* 1970;28(5):551-79.

Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res* 1974;82(2):151-90.

Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1975;3(3):115-9.

Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc.* 1978;96(3):474-9.

Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979;42(6):619-23.

Budtz-Jorgensen E, Kaaber S. Clinical effects of glazing denture acrylic resin bases using a ultraviolet curing method. *Scandinavian journal of dental research.* 1986;94:569-574.

Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(12):1859-63

- Budtz-Jorgensen E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. *Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol Scand.* 1990;48(1):37-43.
- Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Banon-Clément JM, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparasion of edentalous and dentale subjects. *Oral Dis.* 1996;2(4):285-90.
- Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000;28(2):141-9.
- Bunetel L, Bonnaure-Mallet M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy:update and development mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 82(2):161-5.
- Burford-Mason AP, Weber JC, Willoughby JM. Oral Carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy species. *J Med Vet Mycol.*1988;26(1):49-56.
- Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(5):419-24.
- Catalan A, Herrera R, Martinez A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. *J Prosthet Dent.* 1987;57(5):581-6.
- Ceballos A, Gonzalez-Moles M, Urquia M. [Denture stomatitis. Its relation to cãndida albicans]. *Av Odontoestomatol.*1990;6(2):151-4.
- 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.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001a.Sep;183(18):5385-94.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001 b;80(3):903-8.
- Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM, Ghannoum Ma. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol.*2005;71(12):8795-8801.

- Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):887-94.
- Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995;74(3):309-13
- Chen X, Stewart PS. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Wat. Res*. 2000;34(17):4229-33.
- Chen K, Klapper As, Voige H, Priore GDP. A randomized controlled study comparing two standardized closure methods of laparoscopic port sites. *JLS*. 2010;14:391-4.
- Cilli R, de Mattos MC, Honorio HM, Rios D, de Araujo PA, Prakki A. The role of surface sealants in the roughness of composites after a simulated toothbrushing test. *J Dent*. 2009;37:970–977.
- Collis JJ, Stafford GD. A survey of denture hygiene in patients attending Cardiff Dental Hospital. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1994;3(2):67-71.
- Crockett DN, Ogrady JF, Reade PC. *Candida* species and *Candida albicans* morphotypes in erythematous candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73(5):559-63.
- Damgé C, Vranckx H, Balschmidt P, Couvreur P. Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(12):1403-9.
- Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*. 2003;46(5-6):187-91.
- Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970;129(4):151-6.
- Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J*. 1972;133(3):101-5.
- Davidi M, Beyth N, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI. Effect of liquid-polish coating on in vivo biofilm accumulation on provisional restorations: part 1. *Quintessence Int*. 2007 ;38(7):591-6.
- Davidi MP, Beyth N, Weiss EI, Eilat Y, Feuerstein O, Sterer N. Effect of liquid-polish coating on in vitro biofilm accumulation on provisional restorations: Part 2. *Quintessence International*. 2008;39(7):45-9.



- Dickinson GL, Leinfelder KF, Mazer RB, Russell CM. Effect of surface penetrating sealant on wear rate of posterior composite resins. *J Am Dent Assoc.* 1990; 121:251–255
- Dickinson GL, Leinfelder KF. Assessing the long-term effect of a surface penetrating sealant. *J Am dent Assoc.* 1993;124:68-72.
- Dohmen PM. Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimize surgical site infections. *Journal of Hospital Infection.* 2008;70(52):15-20.
- Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL, Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res.* 2005;84(11):966-77.
- Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1387-92.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
- Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(8):411-5.
- dos Santos PH, Pavan S, Consani S, Sobrinho LC, Sinhoreti MA, Filho JN. In vitro evaluation of surface roughness of 4 resin composites after the toothbrushing process and methods to recover superficial smoothness. *Quintessence Int.* 2007;38:247–253.
- Dourado E, Fernandes TCA, Feitosa EF, Lopes MJP. Análise Comparativa entre suturas convencionais e adesivos à base de 2-octil-cianoacrilato: revisão de literatura. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.* 2005;5(1):15-20.
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(11):685-702.
- Emami E, Seguin J, Rompre PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *Int J Prosthodont.* 2007;20(5):514-20.
- Endo MS, Costa JV, Natali MRM, Queiroz AF. Efeito in vivo do etil-cianoacrilato como isolamento absoluto em gengiva inserida. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2007;36(3):287-292.
- Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol.* 2000;18(5):553-62.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors- a large cohort. *J Oral Rehabil.* 2007;34(6):448-55.

Fotos PG, Hellstein JW. Candida and candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. *Dent Clin North Am.* 1992;36(4):857-78.

Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira EFE. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil.* 2008;35(5):370-4.

Gillum AM, Tsay EYH, Kirsch Dr. Isolation of the *Candida albicans* genes for orotidine -59-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet.* 1984;198(1):179-82.

Gonsalves WC, Wrightson AS, Henry RG. Common oral conditions in older persons. *Am Fam Physician.* 2008;78(7):845-52.

Guler AU, Guler E, Yucel AÇ, Ertas E. Effects of polishing procedures on color stability of composite resins. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(2):108-12.

Haghpanah S, Vafafar A, Golzadeh MH, Ardeshiri R, Karimi M. Use of Glubran 2 and Glubran tissue skin adhesive in patients with hereditary bleeding disorders undergoing circumcision and dental extraction. *Ann Hematol.* 2011;90(4):463-8.

Haghpanah S, Vafafar A, Golzadeh MH, Ardeshiri R, Karimi M. Use of Glubran 2 e Glubran tissue skin adhesive in patients with hereditary bleeding disorders undergoing circumcision and dental extraction. *Ann hematol.* 2010;90(4):463-8.

Hassel AW, Milenkovic S, Schürmann U, Greve H, Zaporozhchenko V, Adelung R, Faupel F. Model systems with extreme aspect ratio, tunable geometry, and surface functionality for a quantitative investigation of the Lotus effect. *Langmuir.* 2007; 23: 2091-2094.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* 1994;62(3):915-21.

Herod EL. Cyanoacrylates in dentistry: a review of the literature. *J Can Dent Assoc.* 1950;56:331-4.

Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS. Investigation into the cleanliness of dentures in an elderly population. *J Prosthet Dent.* 1990;64(1):48-52.

Howel JM, Bresnavam KA, Stair TO, Dhindsa HS, Edwards BA. Comparison of effects of suture and cyanoacrylate tissue adhesive on bacterial counts in contaminated lacerations. *Antimicrob Agents Chemot.* 1995; 39(2): 559-60.

Howlett JA, Squier CA. *Candida albicans* ultrastructure colonization and invasion of oral epithelium. *Infect Immun.* 1980;29(1):252-60.

Hube B. From commensal to pathogen: stage-and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(4):336-41.

Hunter KM. Cyanoacrylate tissue adhesive in osseous repair. *Br.Oral Surg.* 1976;14:80-6.

Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992;123(1):46-51.

Jenquim MR, Liebowitz SM, Sarabia RE, McGinity JW. Physical and chemical factors influencing the release of drugs from acrylic resin films. *J Pharm Sci.* 1990;79(9):811-6.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 2005; 159(3):353-60.

Keng SB, Lim M. Denture plaque distribution and the effectiveness of a perborate-containing denture cleanser. *Quintessence Int.* 1996;27(5):341-5.

Kimaid A, Nogueira TO, Araújo A, Salgado MAC, Gomes MF. Avaliação histológica do etil-cianoacrilato na reparação óssea de ratos. *Rev. Odontol. UNESP.*

Koziol-Montewka M, Magrys A, Paluch-Oles L, Bogut A, Buczynski K, Jablonka S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol Invest.* 2006;35(2):167-79.

Kubinova L, Janacek J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. *Micros Res tech.* 2001; 53(6): 425-35.

Kuhar M, Funduk N. Effects of polishing techniques on the surface roughness of acrylic denture base resins. *J Prosthet Dent.* 2005;93(1):76-85.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* 2002;70(2):878-88.

Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil* 1997;24(10):788-90.

Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil.* 2002;29(3):300-4.

Kumamoto CA. Candida biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(6):608-11.

Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;242(2):345-51.

Levrier O, Mekkaoui C, Rolland PH, Murphy K, Cabrol P, Moulin G, et al. Efficacy and low vascular toxicity of embolization with radical versus anionic polymerization of n-butyl-2-cyanoacrylate (NBCA). *J. Neuroradiol.* 2003;30:95-102.

Liaqat I, Sabri AN. Effect of biocides on biofilm bacteria from dental unit water lines. *Curr Microbiol.* 2008;56(6):619-24.

Lima EM, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2006;33(5):356-62.

Lima MECMA, Oliveira AB, Macêdo DR, Mendonça JS. Influência de um selante de superfície na infiltração marginal de restaurações Classe V, em resina composta com margens em dentina. *UFES Ver Odontol.* 2008;10(2):22-6.

Linn JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1999;81:202-6.

Ludlow JB, Kutcher MJ, Samuelson A. Intraoral digital imaging documenting recurrent aphthous ulcer healing in 2-octyl cyanoacrylate versus sham-treated lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89(4):425-31.

Maia CC, Cruz Filho M, Abrahão S, Silva JCCB, Gomes PO, Soufen MA, et al. Efeitos do etil-cianoacrilato na parede venosa de cães. *Acta Cir. Bras.* 2002;17(1):10-13.

Mahonen K, Virtanen K, Larmas M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. *J Oral Rehabil.* 1998;25(4):304-10.

Maia CC, Cruz Filho M, Abrahão S, Silva JCCB, Gomes PO, Soufen MA, et al. Efeitos do etil-cianoacrilato na parede venosa de cães. *Acta Cir. Bras.* 2002;17(1):1-4.

Makihira S, Nikawa H, Nishimura M, Egusa H, Sadamori S, Rahayu R P, Nishimura H. Impact of components of denture acrylic resin on gingival cell growth and sensitivity to *Candida albicans* adhesion. *Mycoses*.2002;45, 300–305.

Mantzikos T, Epstein M. Interior surface sealant for acrylic appliances. *J Clin Orthod*. 1998;32:152-153.

Maza JL, Elguezabal N, Prado C, Ellacuria J, Soler I, Ponton J. *Candida albicans* adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(5):589-92.

Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA. Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. *J Am Dent Assoc*. 1999;130(1):65-72.

Menezes MM, Andreatta Filho OD, Soares LF, Valera MC, Araujo MAM. Avaliação da capacidade de impermeabilização do cianoacrilato e do adesivo dentinário autocondicionante em canais obturados e preparados para retentor intra-radicular. *Cienc Odontol Bras*. 2002;5(3):32-7.

Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Hugland RP. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol*.1997;63(7):2897-905.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008;17(4):312-7.

Montanaro L, Arciola CR, Cenni E, Ciapetti G, Savioli F, Filippini F, et al. Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use. *Biomaterials*. 2001;22:59-66.

Moretti Neto RTM, Mello I, Moretti ABS, Robazza CRC, Pereira AAC. *In vivo* qualitative analysis of the biocompatibility of different cyanoacrylate-based adhesives. *Braz Oral res*. 2008;22(1):43-7.

Mutignani M, Tringali A, Khodadadian E, Petruzzello L, Spada C, Spera G, et al. External Pancreatic Fistulas resistant to conventional endoscopic therapy: endoscopic closure with n-butyl-2-cyanoacrylate (GIlubran 2). *Endoscopy*. 2004;36:738-42.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. *Int J Prosthodont* 2003;16(6):616-20.

Nikawa H, Kotani H, Sadamori S, Hamada T. Denture Stomatitis and ABO blood types. *J Prosthet Dent*.1991;66(3):391-4.

- Nikawa H, Yamamoto T, Hayashi S, Nikawa Y, Hamada T. Growth and or acid production of *Candida albicans* on soft lining materials in vitro. *J. Oral Rehabil.* 1994;21:585-594.
- Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T. Effect of components of resilient denture-lining materials on the growth, acid production and colonization of *Candida albicans*. *J. Oral Rehabil.* 1995;22:817–824.
- Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Kumagai H, Samaranayake LP. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopathologia.* 1997;139(2):87-91.
- Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *J Dent.* 1998;26(4):299-304.
- Nikawa H, Jin C, Hamada T, Murata H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part I. Effects on fungal growth. *J. Oral. Rehabil.* 2000; 27:41–51.
- Nikawa H, Jin C, Hamada T, Makihira S, Kumagai H, Murata H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part II. Effects on fungal colonization. *J Oral Rehabil.* 2000;27(2):124-30.
- Nikawa H, Jin C, Makihira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil.* 2003;30(3):243-50.
- Okada A, Nikaido T, Ikeda M, Okada K, Yamauchi J, Foxton RM, Sawada H, Tagami J, Matin K. Inhibition of biofilm formation using newly developed coating materials with self-cleaning properties. *Dent Mater J.* 2008;27(4):565-72.
- Olsen I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand.* 1974,32(5):329-33.
- Olsson J, van der Heijde Y, Holmberg K. Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Res.* 1992;26(6):428-33.
- Palmieri B. Attualità sui collanti biologici ad uso clinico: I cianoacrilati. Continental Medical Group Trieste. 1994.
- Paranhos HF, Panzeri H, Lara EH, Candido RC, Ito IY. Capacity of denture plaque/biofilm removal and antimicrobial action of a new denture paste. *Braz Dent J.* 2000;11(2):97-104.

Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods of denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007;34:606-612.

Patel JD, Ebert M, Stokes K, Ward R, Anderson JM. Inhibition of bacterial and leukocyte adhesion under shear stress conditions by material surface chemistry. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003;14(3):279-95.

Paz LEC. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(6):1734-1739.

Palmieri B. Attualità sui collanti biologici ad uso clinico: I cianoacrilati. Continental Medical Group Trieste. 1994.

Paz, LEC. Image Analysis Software Based on Color Segmentation for Characterization of Viability and Physiological Activity of Biofilms. 2009;75(6):1734-1739.

Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro Candida colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont.* 2007 ;20(3):308-10.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, ten Cate JM. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(2):86-94.

Perez CR, Hirata R Jr, Silva AHMFT, Sampaio EM, Miranda MS. Effect of a glaze/composite sealant on the 3-D surface roughness of esthetic restorative materials. *Oper Dent.* 2009; 34:674-680

Phillips FA. *Materiais dentários de Skinner.* 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1986.

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary Candida in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil.* 2002;29(11):1115-9.

Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 1985;12(2):177-82.

Qureshi A, Drew PJ, Duthie GS, Roberts AC, Monson JRT. N-butyl cyanoacrylate adhesive for skin closure of abdominal wounds: preliminary results. *Ann R Coll Surg Engl.* 1997;79:414-5.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. J Clin Periodontol. 1990;17(3):138-44.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol 1995;22(1):1-14.

Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of Candida albicans to denture-base materials with different surface finishes. J Dent. 1998;26(7):577-83.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of Candida albicans to denture-base materials in vivo and in vitro. Crit Rev Oral Biol Med.1999;10(1):99-116.

Rahal JS, Mesquita MF, Henriques GE, Nobilo MA. Surface roughness of acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. J Oral Rehabil. 2004;31(11):1075-9.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.2004;98(1):53-9.

Ryou M, Pai RD, Sauer JS, Rattner DW, Thompson CC. Evaluating an optimal gastric closure method for transgastric surgery. Surg Endosc. 2007; 21(4):677-80.

Roahen JO, Lento CA. Using cyanoacrylate to facilitate rubber dam isolation of teeth. J Endod.1992;18:517-9.

Roeder LB, Tate WH, Powers JM. Effect of finishing and polishing procedures on the surface roughness of packable composites. Oper Dent.2000;25:534-543.

Rogers TJ, Balish E. Immunity to Candida albicans. Microbiol Rev. 1980;44(4):660-82.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 1980;25(8-9):611-5.

Santos RL. Estudo clínico comparativo da efetividade do cianoacrilato e prime Bond 2.1 na redução ou eliminação da hipersensibilidade dentinária após terapia periodontal [tese]. Camaragibe (PE):Faculdade de Odontologia de Pernambuco;1999.



- Sarac D, Sarac YS, Kulunk S, Ural C, Kulunk T. The effect of polishing techniques on the surface roughness and color change of composite resins. *J Prosthet Dent.* 2006;96:33–40.
- Saska S, Gaspar AMM, Hochuli-Vieira E. Adesivos a base de cianoacrilato para síntese de tecido mole. *An Bras Dermatol.* 2009;84(6):585-92.
- Saskai S, Roslindo EB, Bolini PDA, Minarelli-Gaspar AM. Uso do adesivo à base de etil-cianoacrilato na reparação óssea. *RBO.* 2004;13-15.
- Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J.* 1997;42(5):343-6.
- Sayinsu K, Isik F, Sezen S, Aydemir B. Effect of blood and saliva contamination on bond strength of brackets bonded with a protective liquid polish and a light cured adhesive. *American Journal of orthodontics and dentofacial orthopedics:official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.*2007;131:391-394.
- Sergio M, Costa JV, Natali MRM, Queiroz AF. Efeito in vivo do etil-cianoacrilato como isolamento absoluto em gengiva inserida. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2007;36(3):287-92.
- Sesma N, Laganá DC, Morimoto S, Gil C. Effect of denture surface glazing on denture plaque formation. *Brazilian Dental Journal,* 2005;16:129-34.
- Shapiro AJ, Dinsmore RC, North JH. Tensile strength of wound closure with cyanoacrylate glue. *Am Surg.* 2001;67:1113-5.
- Shay K. Denture hygiene: a review and update. *J Contemp Dent Pract.*2000;1:28-41.
- Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50(3):535-43.
- Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont.* 2006;19(3):288-93.
- Silvestri A, Brandi C, Grimaldi L, Nisi G, Brafa A, Calabro M, et al. Octyl-2-cyanoacrylate adhesive for skin closure and prevention of infection in plastic surgery. *Aesth. Plast. Surg.* 2006;30:695-9.
- Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 8):966-73.

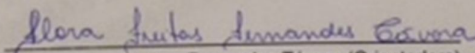
- Takeuchi CY, Orbegoso VHF, Palma RGD, Panzeri H, Lara EH, Dinelli W. Assessing the surface roughness of a posterior resin composite: effect of surface sealing. *Oper Dent.*2003;28:281–286
- Testini M, Lissidini G, Poli E, Gurrado A, Lardo D, Piccinni G. A single-surgeon randomized Trial comparing sutures, n-butyl-2-cyanoacrylate and human fibrin glue for mesh fixation during primary inguinal hernia repair. *Can J Surg.* 2010;53(3):155-60.
- Theilade J, Budtz-Jorgensen E. Electron microscopic study of denture plaque. *J Biol Buccale.* 1980;8(4):287-97.
- Thomas CJ, Nutt GM. The in vitro fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. *J Oral Rehabil.* 1978;5(2):167-72.
- Tommasi MH, Birman EG. *Diagnóstico em Patologia Bucal.* 3 ed. São Paulo:Pancast; 2002.
- Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. 1990; 116(5):546-50
- Toriumi DM, O’Grady K, Desai D, Bagal A. Use of octyl-2-cyanoacrylate for skin closure in facial plastic surgery. *Plast. Reconstr.Surg.*1998;102(6):2209-19.
- Towfigh S, Cheadle WG, Lowry SF, Malangoni MA, Wilson SE. Significant reduction in incidence of wound contamination by skin flora through use of microbial sealant. *Arch Surg.* 2008;143(9):885-91.
- Ueda EL; Hofling-Lima AL; Sousa LB; Tongu MS; Yu MCZ; Lima Aas. Avaliação de um cianoacrilato quanto à esterilidade e atividade biocida. *Arq. Bras.Oftalmol.*2004;67(3):397-400.
- Ueda EL; Ottaiano JAA. Comparação dos gastos com material para reparação de perfurações de córnea com cola de cianoacrilato e sutura de córnea. *Arq.Bras.Oftalmol.*2004;67(1):97-101.
- Ureña JL. Características generales de los hongos patógenos humanos. In: Hill MMG, editor. *Microbiologia Oral.* 1995.p.362-75.
- Van Reenen JF. Microbiologic studies on denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1973;30(4):493-505.
- Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992 ;37(8):613-22.

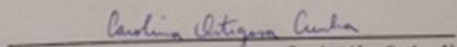
- Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997;77(5):535-9.
- Vitkov L, Krautgartner WD, Hanning M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(1):60-4.
- Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998;25(6):416-23.
- Weber SC, Chapman MW. Adhesive in orthopaedic surgery: a review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. *Clin. Orthop.* 1984; 191:249-61.
- Weiger R, de lucena J, Decker HE. Lost C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J.* 2002; 35(2):166-71.
- Williams DW, Potts AJ, Wilson MJ, Mathews JB, Lewis MA. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med .* 1997; 26(2):83-9.
- Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998;185(8):380-4.
- Wilson SE. Microbial sealing: a new approach to reducing contamination. *Journal of Hospital Infection.* 2008;70(52):11-14.
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.* 2000; 79(1): 21-7.
- Woodward SC, Herrmann JB, Cameron JL, Brandes G, Pulaski EJ, Leonard F. Histotoxicity of Cyanoacrylate Tissue Adhesive in the Rat. *Annals of Surgery.* 1965; 162(1):113-122.
- Zaura-Arite E, van marle J, tem Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.* 2001; 80(5):1436-40.
- Zimmerli B, Koch T, Flury S, Lussi A. The influence of toothbrushing and coffee staining on different composite surface coatings. *Clin Oral Investig.* 2011.
- Zissis A, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000;13(2):136-40.
- Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *Int J Prosthodont.* 2006;19(6):621-5.

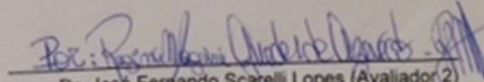
## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Érica Raquel Tristão.

Ao dia oito de dezembro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Érica Raquel Tristão intitulado: "Efeito do etil-cianoacrilato (Super Bonder®) e do polidor líquido de baixa viscosidade (Biscover®) sobre biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica para reembasamento". Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Flora Freiras Fernandes Távora, Dra. Carolina Ortigosa Cunha e Dr. José Fernando Scarelli Lopes. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprovar, com a nota 10.0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.

  
Dra. Flora Freiras Fernandes Távora (Orientadora)

  
Dra. Carolina Ortigosa Cunha (Avaliador 1)

  
Dr. José Fernando Scarelli Lopes (Avaliador 2)