



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA INTEGRADA**

ERMELINDA MATSUURA

Efeito *in vitro* do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) na hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão de *Candida albicans* sobre poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais

MARINGÁ

2013

ERMELINDA MATSUURA

Efeito *in vitro* do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) na hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão de *Candida albicans* sobre poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada do Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia Integrada

Orientador: Prof^a Dr^a Sandra Mara Maciel

Coorientador: Prof. Dr. André Gasparetto

Maringá

2013

ERMELINDA MATSUURA

Efeito *in vitro* do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) na hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão de *Candida albicans* sobre poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada do Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia Integrada

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Flaviana Bombarda de Andrade

Departamento de Endodontia / Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Profª Drª Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Departamento de Análises Clínicas / Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Sandra Mara Maciel

Departamento de Odontologia / Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho

*Aos meus pais,
fonte de amor incondicional*

*Por me proporcionarem sólida formação ética, moral e cultural
Por permitirem que me refletisse através deles*

AGRADECIMENTOS

*À minha família, pelo amor e apoio incondicionais,
àqueles que fazem parte dela por escolha,
àqueles que amo e admiro
Todos vocês sem exceção são especiais!
Pelo amor, cuidado, segurança, bem-estar, motivação e energia
intelectual
Pelo exemplo e inspiração que irradiam em inteligência, cultura,
ética, força, determinação, competência, alegria, criatividade,
gentileza, generosidade, talento e muito mais!
Que orgulho fazer parte dela!*

*À todos os meus queridos amigos e amigas que sempre
torcem por mim e me apoiam, que me entendem e me perdoam
quando muitas vezes não posso estar presente em suas vidas.
Em especial à minha amiga Suzana Goya
que foi uma das primeiras a me incentivar à realização desta
importante etapa de minha vida, que acreditou e apostou em mim
e sempre esteve disponível para me ouvir*

*À Prof^a Dr^a Sandra Mara Maciel, minha querida
orientadora,
por aceitar ser minha orientadora, pela oportunidade de
convivência, pela generosidade e carinho, por compartilhar seus
conhecimentos,
Um exemplo admirável de pessoa, professora e orientadora!*

*À querida Prof^a Dr^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski,
pela generosidade, paciência, gentileza, ensinamentos, por
irradiar sofisticação, simplicidade e sabedoria tudo ao mesmo
tempo, outro exemplo admirável de pessoa, professora e
orientadora!*

*Ao meu orientador Prof. Dr. André Gasparetto, por inspirar
energia criativa, por aceitar ser meu orientador, por acreditar e
apostar em mim e na minha pró-atividade*

*Aos professores do Programa de pós-graduação em Odontologia
Integrada da Universidade Estadual de Maringá por
compartilhar seus valiosos conhecimentos e pela incansável busca
pela qualidade do ensino*

*À equipe do Laboratório de Micologia Médica do
Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de
Maringá, pela acolhida calorosa e ajuda valiosa nos experimentos.*

*Em especial à doutoranda Janine Silva Ribeiro Godoy, pelo
carinho, gentileza e generosidade em compartilhar seus
conhecimentos e a inestimável ajuda nos experimentos e à
doutoranda Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça, pela ajuda nos
experimentos, análise estatística, pela generosidade e gentileza.*

*Aos meus amigos e colegas de metrado pela agradabilíssima
convivência e ricas trocas de experiências*

*Ao Prof. Dr. João Carlos Palozzo de Mello
Por ser tão solícito sempre, pela parceria produtiva, além de
compartilhar experiência e gentileza*

*Aos professores da Disciplina de Dentística do
Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de
Maringá, por ceder aparelhos para a realização de etapas dos
ensaios, em especial à Prof^a Dr^a Renata Corrêa Pascotto e à Prof^a
Dr^a Raquel Sano Suga Terada pelo apoio técnico e pelos valiosos
ensinamentos*

*À Prof^a Dr^a Flaviana Bombarda de Andrade, pela
disponibilidade em participar de minha banca de qualificação e
dissertação, pelas valiosas sugestões, pela simpatia contagiante*

*À equipe administrativa do Departamento de Odontologia
da Universidade Estadual de Maringá, pela gentileza e presteza,
em especial à Sônia, sempre solícita e competente*

*À minha equipe de trabalho, que me entendeu e deu
suporte, quando devido às aulas e atividades do mestrado, não
pude estar presente muitas vezes para o atendimento de meus
pacientes, em especial à minha assistente Franciele que me
apoiou, organizou e facilitou meu dia a dia*

*À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente
para que este trabalho fosse concluído com êxito*

Muito obrigada!

*“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a
nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e,
portanto, é o que temos de mais valioso”*

(Albert Einstein)

Matsuura E. **Efeito *in vitro* do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) na hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão de *Candida albicans* sobre poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais** Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Maringá, 2013.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito *in vitro* do extrato aquoso de guaraná (*Paullinia cupana*) sobre a hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão de *C. albicans* sobre superfícies de poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais (CEB). **Materiais e métodos:** Extrato aceto-aquoso liofilizado de guaraná foi produzido por turbólise (15 min; 40°C) e testado *in vitro*, numa concentração de 10 mg/mL, sobre *C. albicans* ATCC (90028). A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo. Foi determinada a hidrofobicidade em superfície celular (HSC) pelo teste de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH); avaliação da produção de biofilme (90 min); adesão em superfície de poliestireno; adesão em resinas compostas (duas micro-híbridas e uma nanoparticulada); e adesão em CEB. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para validação dos resultados. Cada parâmetro foi avaliado em triplicata e os resultados expressos como média±DP e analisados por ANOVA, testes Kruskal-Wallis e Tukey para múltiplas comparações com nível de significância de 5%. **Resultados:** O extrato de guaraná não inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 10 mg/mL. Aumentou a HSC ($p=0,999$) e diminuiu a adesão em superfície de poliestireno ($p<0,001$), enquanto que a produção de biofilme permaneceu inalterada. Provocou um aumento da adesão em resinas compostas, sendo significativo para a resina nanoparticulada ($p=0,042$) e a diminuição da capacidade de aderência em CEB, tanto na porcentagem de CEB que tiveram leveduras aderidas (de 44 para 29,2), quanto ao número de leveduras aderidas por CEB (de 3,39 para 2,39) $p<0,001$. MEV confirmou o padrão de adesão em resinas compostas. **Conclusão:** Apesar do extrato de guaraná não ter sido efetivo em relação às superfícies de resinas compostas, demonstrou um efeito anti-adesão sobre *C. albicans* em superfície de poliestireno e CEB, indicando uma possível ação na prevenção de candidoses orais.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Paullinia cupana*, adesão, biofilme, resina composta.

Matsuura E. **Effect *in vitro* of extract from guaraná (*Paullinia cupana*) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in polystyrene, composite resin and buccal epithelial cells.** Dissertation (Masters in Dentistry). State University of Maringá, 2013.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect *in vitro* of aqueous extract from guaraná (*Paullinia cupana*) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in polystyrene surface, dental composite resin and buccal epithelial cells (BEC) by *C. albicans*. **Material and methods:** Aceto-aqueous lyophilized extract of guaraná was produced by turbo-extraction and tested *in vitro* on *Candida albicans* ATCC (90028). We evaluated these tests in presence and absence of 10 mg/mL of extract. 1) minimum inhibitory concentration by a microdilution method. 2) cell surface hydrophobicity (CSH) by Microbial Adhesion to Hydrocarbons test (MATH); 3) biofilm production; 4) adhesion polystyrene; 5) adhesion in resin composites (two microhybrids and one nanoparticulate); 6) adhesion in buccal epithelial cells (BEC). Scanning electron micrographs (SEM) were made for validation. Each parameter was evaluated in triplicate and the results expressed as mean \pm SD and analyzed by ANOVA, Kruskal-Wallis and Tukey for multiple comparisons with a significance level of 5%. **Results:** Guaraná extract (10 mg/mL) was not inhibited the growth of *C. albicans*. Induce increased of the HSC ($p=0,999$) and decreased adherence on polystyrene ($p<0,001$), whereas there was no change on biofilm production. Increase adhesion in resin composites, being significant for the nanoparticulate resin ($p=0,042$) and decreased ability to attach on BEC, as in the percentage of BEC which had adhered yeasts (44 to 29,2), in the number of yeasts by CEB (3,39 to 2,39) $p<0,001$. SEM confirmed the pattern of adherence. **Conclusion:** Despite the guaraná extract did not effective in relation to surfaces of resin composites showed an anti-adhesive effect on *C. albicans* in polystyrene surface and CEB, indicating a possible action in the prevention of oral candidosis.

Keywords: *Candida albicans*, *Paullinia cupana*, *Candida* adhesion, *Candida* biofilm, dental resin composite.

LISTA DE FIGURAS

Artigo

- Figura 1** - Influência do extrato de guaraná sobre *C. albicans* considerando o perfil de hidrofobicidade em superfície celular (HSC). Teste Anova (Kruskal-Wallis)67
- Figura 2** - Perfil de adesão de *C. albicans* sobre superfície de poliestireno após exposição ao PBS, extrato de guaraná e clorexidina. Teste Anova (Kruskal-Wallis)68
- Figura 3** - Perfil de adesão em superfície das resinas compostas Llis®, Opallis® e Z350® após exposição ao PBS e extrato de guaraná. Teste Anova (Tukey's).....69
- Figura 4** - Imagens de MEV demonstrando o padrão da adesão de células de *C. albicans* antes e após exposição ao extrato de guaraná; **A)** e **B)** resina composta Llis® antes e após exposição ao extrato de guaraná; **C)** e **D)** resina composta Z350® antes e após exposição ao extrato de guaraná70
- Figura 5** - Imagens de MEV - Crescimento em grumos após exposição ao extrato de guaraná. **A)** e **C)** resina Llis® **B)** e **C)** resina Z350® 71
- Figura 6** - Demonstração da aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais, através de microscopia óptica (40 X)72

Apêndices

- Figura 1** – Cepa de *C. albicans* (ATCC 90028).....75
- Figura 2** – Preparo da cepa de *C. albicans* para ser reativada a 25°C por 24h.....76
- Figura 3** – Crescimento das colônias de *C. albicans* após cultivo de 24 a 37°C.....76
- Figura 4** – Microplaca de poliestireno de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S,

Roskilde, Denmark) utilizada nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Hidrofobicidade de Superfície Celular (HSC), Formação de Biofilme e Adesão em superfície de poliestireno.....77

Figura 5 – Equipamentos utilizados nos ensaios: **A)** Leitora de microplaca (Expert plus – ASYS, UK); **B)** Agitador de tubos (Vórtex AP56 - Phoenix, Brasil); **C)** Incubadora (Shaker NT712); **D)** Espectrofotômetro (Baush & Lomb).....77

Figura 6 – **A)** Tubos em repouso após adição do n-hexadecano; **B)** e **C)** retirada da fase aquosa (esta fase deposita-se abaixo de uma fase turva) e pipetada para microplaca de 96 poços78

Figura 7 – Microscópio óptico de luz invertida (Olympus CK 40) usado para contagem de UFC/campo do ensaio de adesão em superfície de poliestireno.....79

Figura 8 – **A)** e **B)** *C. albicans* antes e após exposição ao extrato de guaraná **C)** após a exposição à solução de clorexidina79

Figura 09 – Resinas compostas Llis®, Opallis® e Z350® usadas para o ensaio de adesão em superfície de resinas compostas.....80

Figura 10 – **A)** Matriz utilizada para confecção dos corpos de prova de resina composta; **B)** Corpo de prova de resina composta81

Figura 11 – **A)** Aparelho fotopolimerizador LED (SDI Dental Equipment Products – Australia); **B)** Matriz com resina composta interposta com duas lâminas de vidro protegidas com película de retroprojeter.....81

Figura 12 – Microplaca de 24 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) com corpos de prova de resina composta82

Figura 13 – **A)** e **B)** inóculo sendo inserido em gotas em SDA; **C)** e **D)** Após 18 h de incubação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e contagem das UFC.....82

Figura 14 – **A)** Aparelho de ponto crítico; **B)** Microscópio eletrônico de

varredura (MEV) 83

Figura 15 – A) espécimes de resina composta após recobrimento de camada de ouro; **B)** Aparelho metalizador utilizado para aurificação dos corpos de prova84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características e propriedades físicas das resinas compostas testadas.....	73
Tabela 2 - Perfil de aderência de <i>C. albicans</i> sobre células epiteliais bucais após exposição ao PBS, extrato de guaraná e solução de clorexidina.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CEB	Célula(s) epitelial(s) bucal(s)
CIM	Concentração inibitória mínima
DO	Densidade óptica
HSC	Hidrofobicidade de superfície celular
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
mW/cm²	Miliwatts por centímetro quadrado
MATH	Microbial adhesion test hidrocarbons
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão salina fosfato
rpm	Rotações por minuto
SDA	Agar Sabouraud Dextrose
SDB	Caldo Sabouraud Dextrose
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFC/campo	Unidades formadoras de colônias por campo microscópico
YNB	Yeast Nitrogen Broth
YPD	Yeast Peptona Dextrose
µm	Micron
µL	Micro litro

SUMÁRIO

I) CONTEXTUALIZAÇÃO.....	17
Proposição.....	23
Delineamento do estudo.....	23
Referências.....	25
II) ARTIGO CIENTÍFICO.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	38
1. Introdução.....	40
2. Materiais e métodos.....	42
3. Resultados.....	48
4. Discussão.....	51
5. Conclusão	55
Referências	56
Legendas de Figuras.....	65
Legendas de Tabelas.....	66
Figuras.....	67
Tabelas.....	73
APÊNDICES.....	75
ANEXO	85

I) CONTEXTUALIZAÇÃO

Segundo a literatura científica, o gênero *Candida* é constituído por micro-organismos comensais presentes na microbiota normal de indivíduos saudáveis.¹⁻⁴ Entretanto, quando ocorre uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, pode comportar-se como patógeno oportunista, produzindo infecções. Estas infecções podem se apresentar desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas,³⁻⁸ as quais podem atingir taxas de mortalidade entre 40 e 60%.^{9,10} As leveduras do gênero *Candida* possuem importante relevância clínica, devido à alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano. Estudos demonstram que espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 80% da população adulta saudável.³⁻⁸ Em pesquisas realizadas nos Estados Unidos, esse patógeno foi apontado como a quarta causa de infecção da corrente circulatória em hospitais.⁹ Na cavidade bucal, além de diversas formas de candidoses, essas leveduras podem estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais.¹¹

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos.^{6,8,12-19} É a espécie de *Candida* de maior conhecimento patogênico, devido aos diversos fatores de virulência já descobertos. Além disso, é o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado, o que possibilita uma variedade de experimentos e, portanto, um grande avanço na biologia deste fungo, principalmente na expressão dos genes.^{20,21} É um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprobiótico,

estando associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), encontradas em processos patogênicos. Possui ainda, a capacidade de adaptação a diferentes nichos biológicos.^{22,23}

Embora o sistema imune do hospedeiro seja o principal fator responsável pelo equilíbrio entre a transição de comensalismo à patogenicidade, vários atributos como a habilidade de transição morfológica (tubo germinativo), hidrofobicidade em célula ou superfícies abióticas, capacidade em aderir, formação de biofilme, entre outros têm sido apontados como importantes fatores de virulência. Estes fatores podem contribuir para a persistência da colonização e do desenvolvimento de infecções de origem fúngica.²⁴⁻²⁶

O perfil de hidrofobicidade da superfície celular (HSC) está intimamente relacionado ao potencial patogênico de leveduras.^{27,28} Quando células hidrofóbicas e hidrofílicas são comparadas, as hidrofóbicas aderem mais à superfícies e a objetos inanimados, assim como, são mais resistentes à fagocitose e tem maior capacidade em formar tubos germinativos.²⁸ A HSC no gênero *Candida* varia de acordo com as condições de crescimento, morfologia celular e mesmo entre as diferentes espécies do gênero.^{28,29} Contribui assim, para interações hidrofóbicas entre as células e as superfícies, sendo considerado um fator importante para a adesão de *C. albicans* a superfícies inertes.³⁰⁻³² Quando se analisa a HSC, deve se considerar que é um processo dinâmico que pode ser modificado por vários fatores.³³ Embora a literatura mostre que leveduras hidrofóbicas são mais virulentas que as não hidrofóbicas,^{28,34,35} diversos estudos não encontraram uma correlação entre

HSC e energia livre de superfície sobre a adesão de fungos, demonstrando que a HSC da célula sozinha não é suficiente para a atividade de adesão.^{32,36-39}

O estágio inicial de várias doenças microbianas envolve a adesão de micro-organismos ao tecido alvo.^{40,41} A adesão de leveduras a células epiteliais bucais e vaginais^{42,43} é um processo essencial para a colonização microbiana e para o desencadeamento do processo patogênico, uma vez que a colonização prévia é reconhecida como predisponente ao processo infeccioso.⁴⁴ Os mecanismos de aderência destas leveduras aos tecidos humanos são variados e acontecem como resultado dos sistemas de reconhecimento celular *Candida*-hospedeiro, que são extremamente complexos e envolvem uma variedade de componentes ligantes-receptores.⁴⁵ Várias interações específicas entre *C. albicans* e instrumentos médicos e tecidos do hospedeiro^{46,47} têm sido descritas e podem facilitar a sua sobrevivência nestes ambientes.^{20,47}

A capacidade de formar biofilme tem sido associada como um potencial fator de virulência e resulta da capacidade do micro-organismo em aderir. Isso ocorre em resposta a uma variedade de condições, como o metabolismo da levedura, quantidade de nutrientes para a replicação celular e a superfície de contato, fatores ambientais, morfogênese e a espécie de *Candida* envolvida na infecção.^{27,48,49} De maneira geral, o desenvolvimento de um biofilme envolve quatro etapas: primeiro ocorre a adesão dos micro-organismos à superfície; depois, uma formação discreta de colônias e organização de células; em seguida ocorre a secreção de matriz extracelular (polissacarídeos) e maturação de uma estrutura tridimensional, e por último a disseminação de células^{25-27,49}

Biofilmes podem se formar em inúmeras superfícies, como teflon, plásticos, látex, silicone, e especificamente na cavidade bucal sobre próteses totais e removíveis, dispositivos de aparelhos ortodônticos e superfícies de restaurações.^{48,50}

Souza et al.³⁰ avaliaram as diferenças na HSC entre as cepas de *C. albicans* obtidas de dois grupos de pacientes idosos institucionalizados, com e sem sinais clínicos de candidose relacionada à prótese total. Seus resultados demonstraram que populações naturais de *C. albicans* isoladas destes pacientes não diferiram entre si em relação à HSC. Outros atributos de virulência, bem como fatores inerentes do hospedeiro, também poderiam estar implicadas na manifestação clínica destas candidoses.

Elguezabal et al.³ avaliaram a influência da saliva na adesão de *C. albicans* ao polimetilmetacrilato (PMMA) e seus resultados mostraram que a saliva total diminui a adesão de *C. albicans* ao PMMA, embora esta função dependa da fase morfológica da levedura.

De acordo com Maza et al.,⁵¹ a capacidade de formar tubos germinativos e a presença de saliva humana são fatores importantes para a adesão de *C. albicans* sobre superfícies de resina composta.

Para comparar a adesão da *C. albicans* à superfície de 14 resinas compostas comumente utilizadas na prática odontológica, Burges et al.³⁶ realizaram um estudo, onde avaliaram a rugosidade e hidrofobicidade de superfície destes materiais. Os resultados demonstraram que não houve uma correlação conclusiva entre rugosidade e hidrofobicidade de superfície de *C. albicans* aderidas.

O processo de adesão da *C. albicans* é complexo e envolve fatores biológicos e não biológicos. Variações na superfície das leveduras exercem um papel crítico no fenômeno de adesão.¹ Além disso, fatores como energia livre de superfície do substrato envolvendo forças eletrostáticas de atração e repulsão, a rugosidade da superfície da resina composta interferem na adesão e colonização por *C. albicans*.³⁶ Os efeitos de materiais restauradores sobre os micro-organismos na cavidade bucal, a maneira como estes materiais foram inseridos nas fases do procedimento restaurador e ainda, a adesão de micro-organismos sobre estes, devem ser considerados de suma importância na patogênese da *C. albicans* na cavidade bucal.^{52,53}

Entre as várias estratégias para controlar a formação e o acúmulo de biofilme na cavidade oral, a higiene bucal tem um papel inquestionável na manutenção da saúde dos dentes e periodonto.⁵⁴ Pesquisas tem sido realizadas com várias substâncias em ensaios clínicos e laboratoriais com o objetivo de inibir o crescimento de micro-organismos que causam doenças na cavidade bucal. Entre estas substâncias está a solução de clorexidina,⁵⁵ a qual constitui-se num efetivo composto usado como antisséptico bucal devido à sua eficiência clínica sobre uma ampla gama de micro-organismos na cavidade bucal.⁵⁵⁻⁵⁷ No entanto, a aplicação de agentes antissépticos na cavidade bucal deve ser cuidadosamente acompanhada devido a seus efeitos colaterais, apesar do conhecido benefício destes agentes.⁵⁸ O uso contínuo da solução de clorexidina pode causar manchas no dorso lingual e esmalte dental, além de induzir mudanças no paladar e descamações na mucosa bucal, sendo seu uso indicado somente por curtos períodos.^{58,59} Estudos indicam que a clorexidina

tem efeitos tóxicos em células humanas e na granulação dos tecidos^{59,60} e que, concentrações desta solução bem abaixo daquelas usadas na odontologia clínica tem sido relatadas como a causa de injúrias, morte celular e inibição de síntese de proteínas em cultura de fibroblastos humanos.⁶⁰

Atualmente, o emprego de plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças tem sido apoiado pela classe médica e por programas oficiais de saúde.⁶¹ No Brasil existem várias espécies vegetais nativas que são consideradas medicinais,⁶²⁻⁶⁵ mas muitas ainda não tiveram adequada validação científica.⁶² No âmbito odontológico, o interesse por pesquisas com produtos naturais têm aumentado nos últimos anos, devido à busca por novos produtos com melhor atividade farmacológica, menor toxicidade e custos mais acessíveis à população.^{37,66-72}

Polaquini et al.³⁷ observou uma ação anti-adesão do extrato aquoso de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) ao pesquisar o efeito deste na HCS, formação de biofilme e adesão de *C. albicans* sobre resina composta.

Paullinia cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae), conhecida popularmente como guaraná, é uma planta nativa da Amazônia central. Suas sementes são usadas tradicionalmente pelos indígenas para o preparo de bebidas estimulantes em eventos festivos.^{73,74} Possui propriedades antioxidantes, antiamnésicos, estimulantes, adaptogênicas, antidepressivas e “antistress”^{73,74} e antimicrobianas.⁶⁴ Contêm grandes quantidades de flavonóides (catequinas e epicatequinas) e taninos.⁷⁵⁻⁷⁷ Cabe salientar uma importante característica dos taninos, que é o seu potencial antioxidante.⁷⁸ Além disso, as enzimas, tais como a glicosiltransferase, produzida por

Streptococcus mutans e *S. sobrinus*, são inibidas *in vitro* por taninos, impedindo a formação de placa bacteriana e inflamações da boca e garganta.^{79,80} Considerando as propriedades medicinais do extrato de guaraná, estudos de atividades antimicrobianas desta espécie podem ser de grande interesse para as Ciências Médicas em geral e particularmente para a Odontologia.

Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*), sobre a levedura *Candida albicans*. Foram avaliados *in vitro* a hidrofobicidade de superfície celular, formação de biofilme e adesão de *C. albicans* sobre superfície de microplaca de cultura de poliestireno, superfícies de três marcas de resinas compostas disponíveis comercialmente (Z350®, Opallis® e Llis®) e células epiteliais bucais de indivíduo saudável.

Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo *in vitro*, no qual foram desenvolvidos os seguintes ensaios laboratoriais:

- 1) Concentração inibitória mínima;
- 2) Hidrofobicidade de superfície celular (HSC);
- 3) Capacidade de formação de biofilme;
- 3) Adesão em superfície de poliestireno;
- 5) Adesão em superfícies de resinas compostas;
- 6) Microscopia eletrônica de varredura e

7) Adesão em células epiteliais bucais

A ordenação dos ensaios seguiu um padrão de complexidade crescente, ou seja, da menor à maior complexidade, conforme parâmetros da área da Micologia Médica. E ainda, os seis primeiros estão relacionados à superfícies inertes e o último em células epiteliais bucais humanas. Os ensaios seguiram o protocolo adotado pelo Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, os quais estão descritos na seção Materiais e Métodos. A cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) utilizada nos ensaios foi fornecida por este Laboratório.

O extrato de guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae)] foi fornecido pelo Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, na sua forma de extrato bruto, e os ensaios foram realizados com as informações técnicas disponíveis, fornecidas por este Laboratório.

Referências

1. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses* 2006;**49**:80-4.
2. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:1200-8
3. Elguezabal N, Maza JL, Dorronsoro S, Pontón J. Whole saliva has a dual role on the adherence of *Candida albicans* to polymethylmetacrylate. *Open Dent J* 2008;**2**:1-4.
4. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. *Oral Dis* 2008;**14**:138–43.
5. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS* 1998;**106**:736–42.
6. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont* 2003; **12**:249-54.
7. Silva CRG, Melo KE, Leão MVP, Ruis R, Jorge AOC. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;**30**:300-5.
8. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000 2009;**49**:39-59.

9. Conde-Rosa A, Amador R, Pérez-Torres D. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *P R Health Sci J* 2010;**29**:26-9.
10. Taur Y, Cohen N, Dubnow S, Paskovaty A, Seo SK. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:184–190.
11. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North A* 2006;**20**:485–506.
12. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *OOOOE* 1998;**85**:86-93.
13. Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP, et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;**97**:253-7.
14. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* 2002;**110**:601–10.
15. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;**16**:296-300.
16. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS*

- 1995;**103**:707–13.
17. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M, Yuen KY. Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. *J Med Microbiol* 1994;**41**:250–58.
 18. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* 1985;**47**:11–4.
 19. Samaranayake LP, MacFarlane TW. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980;**25**:603-9.
 20. Magee BB, Magee PT. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2005;**22**:187-93.
 21. Tiraboschi IN, Carnovale S, Benetucci A, Fernández N, Kurlat I, Foccoli M et al. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatología. *Rev Iberoam Micol* 2007;**24**:263-67.
 22. Chaffin W.L, López-Ribot J.L, Casanova M, Gozalbo D, Martínez J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Bio Rev* 1998;**62**:130–80.
 23. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia médica: fungos actinomicetos de interesse médico*. São Paulo. Sarvier. 1991;8.
 24. Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM, Svidzinski TIE. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathol* 2005;**159**:501–7.
 25. Irie MMT, Consolaro MEL, Guedes TA, Donatti L, Patussi EV, Svidzinski TIE. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human

- vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 2006;**20**:195–203.
26. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008;**14**:582–90.
 27. Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infect Immun* 1995;**63**:1373–9.
 28. Masuoka J, Hazen KC. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains *Infect Immun* 2001;**72**:6230–6.
 29. Van der Mei HC, Bos R, Busscher HJ. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids Surf B Biointerf* 1998;**11**:213–21.
 30. Souza RD, Mores AU, Cavalca L, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. *Gerodontology* 2009;**26**:157-61.
 31. Hazen KC, Wu JG, Masuoka J. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun* 2001;**69**:779–86.
 32. Klotz SA. The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiol Lett* 1994;**120**:257-62.
 33. Anil, S., Ellepola, A. and Samaranayake, L. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis* 2001;**7**:119–22.
 34. Hazen KC, Hazen BW. Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;**107**:83–7.

35. Pereira 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**:308–10.
36. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Rosentritt M, Handel G, Hahnel S. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. *Clin Oral Invest* 2009;**13**:293–99.
37. Polaquini, SRB, Svidzinski, TIE, Kemmelmeier, C, Gasparetto, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilme formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. *Arch Oral Biol* 2006;**51**:482-90.
38. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont* 2005;**18**:392–8
39. Gasparetto A. Virulência de amostras orais de *Candida albicans*: novas abordagens metodológicas no estudo da produção de exoenzimas, aderência, formação de biofilme e influência de campos magnéticos. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2004.
40. Pizzo G, Julianna G, Milici ME, D'Angelo M. Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Clin Oral Invest* 2001;**5**:172—6.
41. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;**284**:1318—22.

42. Godoy J, Bonfim-Mendonça PS, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Peralisi N et al. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *J Oral Pathol Med* 2012.
43. Jabra-Rizk MA, Falkler WAJ, Merz, WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human bucal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol* 2001;**18**:17-22.
44. Kamai Y., M. Kubota, Y. Kamai, T. Hosokawa, T. Fukuoka, S. G. Filler. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2002; **70**:5256-58.
45. Grimaudo NJ, Nesbitt WE. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. *Oral Microbio. Immunol* 1997;**12**:168-73.
46. Lamfon H, Porter SR, McCulloough M, Pratten J. Formation of *Candida* biofilms on non shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* 2003;**111**:465—71.
47. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003;**11**:30—6.
48. O'toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Rev Microbiol* 2000;**54**:49-79.
49. Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* Biofilm Formation. *J Dent Res* 2009;**88**:105-15.
50. Donlan R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:881-90.
51. Maza JL, Elguezabal N, Prado C, Ellacuría J, Soler I, Ponton J. *Candida*

albicans adherence to resin-composite restorative dental material: Influence of whole human saliva. OOOOE;2002;**94**:589-92.

52. Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. J Oral Rehabil 2004;**31**:278-85.
53. Busscher HJ, Rinastiti M, Seswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. J Dent Res 2010;**89**:657-65.
54. Pai RM, Acharya LD, Udupa N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel—a 6-week clinical study. J Ethnopharmacol 2004;**90**:99—103.
55. Addy M, Wright R. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouth rinses. J Clin Periodontol 1978;**5**:198-205.
56. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. Oral Dis 2001;**7**:11—7.
57. Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. Eur J Oral Sci 2003;**111**:144-8.
58. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. Intern Endodont J 2010;**43**:430–5.
59. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of

- human alveolar bone cells. Clin Oral Invest 2007;**11**:155–64.
- 60.** Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. Toxicol In Vitro 2008;**22**:308–17.
- 61.** BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Núcleo Técnico da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Cadernos de Atenção Básica; n. 31 – Brasília : Ministério da Saúde 2012;**1**:156.
- 62.** Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev bras Farmacogn 2008;**18**:472-508.
- 63.** Castilho AR, Murata RM, Pardi V. Produtos naturais em odontologia. Rev Saúde 2007;**1**:11-9.
- 64.** Yamaguti-Sasaki E, Ito, LA, Canteli, VCD, Ushirobira, TMA, Ueda-Nakamura, T, Dias Filho BP, Nakamura, CV, Mello, JCP de. Antioxidant Capacity and In Vitro Prevention of Dental Plaque Formation by Extracts and Condensed Tannins of *Paullinia cupana*. Molecules 2007; **12**:1950-63.
- 65.** Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Rev Bras Farmacogn 2006;**16**:408-20.
- 66.** Groppo FC, Bergamaschi CC, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RHL, Andrade ED. Use of Phytotherapy in Dentistry. Phytother Res 2008;**22**:993–

- 98.
67. Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BPFA. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. OOOOE 2007;**104**:709–16.
68. Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, et al. *In vitro* and in vivo effects of isolated fractions of *Brazilian propolis* on caries development. J Ethnopharmacol 2005;**101**:110–5.
69. Pistorius A, Willershausen B, Steinmeier EM, Kreisler M. Efficacy of subgingival irrigation using herbal extracts on gingival inflammation. J Periodontol 2003;**74**:616–22.
70. Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). Review. J Med Microbiol 2001;**50**:299–302.
71. Vanka A, Tandon S, Rao SR, Udupa N, Ramkumar P. The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* mouthwash on *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* growth. Indian J Dent Res 2001;**12**:133–44.
72. Scherer W, Gultz J, Lee SS, Kaim J. The ability of an herbal mouthrinse to reduce gingival bleeding. J Clin Dent 1998;**9**:97–100.
73. Otobone, FJ, Sanches, AC, Nagae, RL, Martins, JVC, Obici, S, Mello, JCP et al. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) ducke] on cognitive performance in morris water maze in rats. Braz Arch Biol Technol 2005;**48**:723-28.
74. Otobone FJ, Sanches ACC, Nagae R, Martins JVC, Sela, VR, Mello JCP de, Audi, EA. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia*

- cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 2007;**21**:531–35.
75. Pelozo, MIG, Cardoso, MLC, Mello, JCP. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Braz Arch Biol Technol* 2008;**51**:447-51.
76. Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *Eur Food Res Technol* 2007;**225**:569-77.
77. Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemoter* 2006;**58**:942-49.
78. Antonelli-Ushirobira, T.M.; Yamaguti, E.; Uhemura, L.M.; Mello, J.C.P. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farm Bonaerense* 2004;**23**:383-86.
79. Ushirobira, T.M.A.; Yamaguti, Nakahara, K.; Kawabata, S.; Ono, H.; Ogura, K.; Tanaka, T.; Ooshima, T.; Hamada, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. *Appl Environ Microbiol* 1993;**59**:968-73.
80. Scholz, E. *Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie*. *Deutsch Apoth Ztg* 1994;**134**: 3167-79.

II) ARTIGO CIENTÍFICO

Effect *in vitro* of extract from guaraná (*Paullinia cupana*) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in polystyrene, composite resin and buccal epithelial cells*

Ermelinda Matsuura^a, Janine Silva Ribeiro Godoy^b, João Carlos Palazzo de Mello^c, Terezinha Inez Estivalet Svidzinskib^b, André Gasparetto^a, Sandra Mara Maciel^a

^aDepartment of Dentistry, State University of Maringá, Av. Mandacaru 1.550, Maringá, Paraná, Brazil, ZIP Code: 87080-000

^bSection of Medical Mycology, Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, bloco T20 sala 11, Maringá, Paraná, Brazil, ZIP Code: 87020-900

^cDepartment of Pharmacy and Pharmacology, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá, Paraná, Brazil, ZIP Code: 87020-900

Corresponding author:

Ermelinda Matsuura

Universidade Estadual de Maringá, Av. Mandacaru 1.550, Maringá, Paraná, Brazil, ZIP Code: 87080-000. Telephone: +55 44 91031441, Fax: +055 44 30319051.

E-mail address: ematsuura1@gmail.com (E. Matsuura)

*Artigo formatado conforme normas de publicação do periódico científico
***Archives of Oral Biology* (Anexo A)**

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito *in vitro* do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) na hidrofobicidade, formação de biofilme e adesão de *C. albicans* sobre superfícies de poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais (CEB).

Materiais e métodos: Extrato aceto-aquoso liofilizado de guaraná foi produzido por turbólise (15 min; 40°C) e testado *in vitro*, numa concentração de 10 mg/mL, sobre *C. albicans* ATCC (90028). A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo. Foi determinada a hidrofobicidade em superfície celular (HSC) pelo teste de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH); avaliação da produção de biofilme (90 min); adesão em superfície de poliestireno; adesão em resinas compostas (duas micro-híbridas e uma nanoparticulada); e adesão em CEB. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para validação dos resultados. Cada parâmetro foi avaliado em triplicata e os resultados expressos como média±DP e analisados por ANOVA, testes Kruskal-Wallis e Tukey para múltiplas comparações com nível de significância de 5%. **Resultados:** O extrato de guaraná não inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 10 mg/mL. Aumentou a HSC ($p=0,999$) e diminuiu a adesão em superfície de poliestireno ($p<0,001$), enquanto que a produção de biofilme permaneceu inalterada. Provocou um aumento da adesão em resinas compostas, sendo significativo para a resina nanoparticulada ($p=0,042$) e a diminuição da capacidade de aderência em CEB, tanto na porcentagem de CEB que tiveram leveduras aderidas (de 44 para 29,2), quanto ao número de leveduras aderidas por CEB (de 3,39 para 2,39) $p<0,001$. MEV confirmou o padrão de adesão em resinas compostas.

Conclusão: Apesar do extrato de guaraná não ter sido efetivo em relação às superfícies de resinas compostas, demonstrou um efeito anti-adesivo sobre *C. albicans* em superfície de poliestireno e CEB, indicando uma possível ação na prevenção de candidoses orais.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Paullinia cupana*, adesão, biofilme, resina composta.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect *in vitro* of extract from guaraná (*Paullinia cupana*) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in polystyrene surface, dental composite resin and buccal epithelial cells (BEC) by *C. albicans*.

Material and methods: Aceto-aqueous lyophilized extract of guaraná was produced by turbo-extraction and tested *in vitro* on *Candida albicans* ATCC (90028). We evaluated these tests in presence and absence of 10 mg/mL of extract. 1) minimum inhibitory concentration by a microdilution method. 2) cell surface hydrophobicity (CSH) by Microbial Adhesion to Hydrocarbons test (MATH); 3) biofilm production; 4) adhesion polystyrene; 5) adhesion in resin composites (two microhybrids resins and one nanoparticulate resin); 6) adhesion in buccal epithelial cells (BEC). Scanning electron micrographs (SEM) were made for validation. Each parameter was evaluated in triplicate and the results expressed as mean \pm SD and analyzed by ANOVA, Kruskal-Wallis and Tukey for multiple comparisons with a significance level of 5%. **Results:** Guaraná extract (10 mg/MI) was not inhibited the growth of *C. albicans*. Induce increased of the HSC ($p=0.999$) and decreased adherence on polystyrene ($p<0,001$), whereas there was no change on biofilm production. Increase adhesion in resin composites, being significant for the nanoparticulate ($p=0,042$) and decreased ability to attach on BEC, as in the percentage of BEC which had adhered yeasts (44 to 29,2), in the number of yeasts by CEB (3,39 to 2,39) $p<0,001$. SEM confirmed the pattern of adherence. **Conclusion:** Despite the guaraná extract did not effective in relation to surfaces of resin composites showed an anti-adhesive effect on *C. albicans* in polystyrene surface and CEB,

indicating a possible action in the prevention of oral candidosis.

Keywords: *Candida albicans*, *Paullinia cupana*, *Candida* adhesion, *Candida* biofilm, dental resin composite.

1. Introdução

Candida é um micro-organismo comensal encontrado na microbiota intestinal e bucal humana, ¹⁻⁴ sendo considerado oportunista, pois sob determinadas condições predisponentes, pode tornar-se patogênico e causar aproximadamente 80% das infecções de origem fúngica. ³⁻⁹ Estas infecções, podem incluir desde lesões superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas, as quais podem atingir taxas de mortalidade entre 40 e 60%.^{10,11}

Entre as espécies do gênero *Candida* identificadas na cavidade bucal humana, *C. albicans* é a mais prevalente, ^{1,5,6,9,12-18} sendo sua capacidade de adesão a qualquer substrato bucal, o primeiro e essencial estágio na formação de um biofilme, um dos principais atributos relacionados ao seu caráter patogênico. ^{19,20} A notável capacidade de adesão de *C. albicans* sobre superfícies bióticas, tais como dentes ou mucosa, ^{1,21} e abióticas tais como, próteses de base acrílica, ^{1-3,5-7,13,15,17,18,22,23} superfícies de metal como os dispositivos de aparelhos ortodônticos ²⁴ e superfícies de restaurações dentais ^{19,25} representa um importante fator predisponente ao processo infeccioso. ²⁶ Entre outras características associadas a essa particularidade destaca-se a hidrofobicidade da superfície celular (HSC) que contribui para interações hidrofóbicas entre as células e as superfícies exercendo importante papel na adesão de *C. albicans* a superfícies inertes. ^{23,27,28}

Estomatites causadas por *C. albicans* afetam cerca de 67% dos usuários de prótese total, geralmente idosos, com higiene bucal deficiente, ^{1,19,23,29,30} o que pode explicar a concentração de estudos sobre a adesão de leveduras focando materiais de próteses com base em resina acrílica. ^{1-3,5-7,13,15,17,18,22,23}

Contudo, estas infecções e suas sequelas têm sido cada vez mais encontradas em outros grupos de indivíduos não usuários destas próteses, principalmente pacientes sob condições de imunossupressão.^{4,19,31} Materiais restauradores diretos também deveriam ser considerados e avaliados como um importante reservatório de *C. albicans* na cavidade bucal.¹⁹ No entanto, poucos estudos foram desenvolvidos para investigar a adesão dessa levedura a resinas compostas.^{19,25,32,33}

A aplicação de agentes antissépticos na cavidade bucal, como a clorexidina, deve ser cuidadosamente acompanhada devido a seus efeitos colaterais, apesar do conhecido benefício deste agente.³⁴ O interesse em pesquisas com produtos naturais têm aumentado nos últimos anos, devido à busca por novas substâncias com melhor atividade farmacológica, menor toxicidade e custos mais acessíveis à população.³⁵⁻⁴¹ Em diversas áreas da Odontologia, já foram testados vários extratos de plantas medicinais.^{33,36,41}

No Brasil existem várias espécies vegetais nativas que são consideradas medicinais,^{35,37,38,41} porém muitas ainda não tiveram comprovada validação científica.³⁷ *Paullinia cupana*, conhecida popularmente como guaraná, é uma planta nativa da Amazônia central. O extrato de suas sementes é utilizado para o preparo de bebidas estimulantes, pois é rico em cafeína, além de flavonóides (catequinas e epicatequinas) e taninos.⁴²⁻⁴⁴ Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram também propriedades antioxidantes, anti-ansiosas, estimulantes, adaptogênicas, antidepressivas, “antistress”^{45,46} e antimicrobianas.⁵¹ Considerando suas propriedades medicinais, estudos da atividade antimicrobiana desta espécie podem ser de grande interesse para as Ciências

Médicas em geral e particularmente para a Odontologia.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) sobre a HSC, formação de biofilme e adesão de *C. albicans* sobre superfícies de poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção da cepa, extrato de guaraná, determinação dos controles e cultivos

C. albicans (ATCC 90028) foi obtida do banco de leveduras do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. Foi reativada 24 h antes de cada experimento em caldo YPD (1% yeast extract, 2% peptone e 2% dextrose) (YPD - Difco, USA) dissolvido em água destilada pH 6.5. Em seguida foi cultivada por 24 h em ágar YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar). Após estes períodos foi ressuspensa em Tampão salina fosfato (PBS) (2.7 mM de KCl e 157 mM de NaCl em 10 mM de tampão fosfato potássio). A concentração do inóculo foi ajustada em hemocitômetro tipo Neubauer (Sigma,USA).

O extrato aceto-aquoso liofilizado de guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] foi produzido por turbólise (15 min; 40°C) em forma de pó pelo laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil (patenteado PI 0006638-9, Brazil)⁴⁷. O pó foi suspenso em água destilada ultrapura esterilizada a uma concentração final de 10 mg/mL.

Foi utilizado como controle positivo, uma solução de clorexidina numa

concentração final de 0,125% (digluconato de clorexidina 2%, FGM, Brazil) e como controle negativo o PBS (tampão salina fosfato (2.7 mM de KCl e 157 mM de NaCl em 10 mM de tampão fosfato potássio)).

2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a protocolo M27 – A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008),⁵⁷ com algumas modificações para produtos naturais. Dez diluições em série do extrato de guaraná foram realizadas a partir de uma concentração de 10 mg/mL e, testadas contra inóculo a 5×10^5 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). A solução de clorexidina usada como controle foi diluída a partir de uma concentração de 2%. Os ensaios foram feitos em quadruplicata.

2.3 Hidrofobicidade da superfície celular (HSC)

A HSC foi determinada pelo Teste de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH) com algumas modificações.^{58,59}

Em tubos de vidro foram adicionados o inóculo (INOC) (350 μ L; $1 - 2 \times 10^5$ UFC/mL) mais extrato de guaraná (GUAR) (350 μ L; concentração final a 10 mg/mL); ou solução de clorexidina (CLOR) (350 μ L; concentração final a 0,125%); ou PBS (350 μ L). Na sequência, 100 μ L foram transferidos da suspensão de cada tubo, para uma microplaca de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) e foi realizada a leitura inicial por densidade ótica (DO) a 0,5 em 620 nm em leitora de microplaca (Expert plus – ASYS, UK). Para cada um dos três tubos de vidro contendo a suspensão restante (600 μ L), foram adicionados 150 μ L de *n*-hexadecano (Sigma Chemical Co, EUA). Cada tubo foi

agitado por 3 min em agitador de tubos (Vórtex AP56 - Phoenix, Brasil) para que todas as leveduras entrassem em contato com parte hidrofílica e hidrofóbica. Os tubos foram deixados em repouso por 15 min, para que ocorresse a separação das fases aquosa e não-aquosa. A seguir foram pipetados 100 µL da fase aquosa de cada tubo para outra microplaca. Foi realizada a segunda leitura (final) da DO sob as mesmas condições. Os testes foram feitos em triplicata e tubos sem leveduras serviram como controle.

2.4 Formação de biofilme

A capacidade de produzir biofilme foi avaliada segundo a metodologia de Shin et al. (2002)⁶⁰ com algumas modificações.

Em cada poço de uma microplaca de 96 poços, em triplicata, foi adicionado o INOC (20 µL; $1 - 2 \times 10^7$) suplementado com 160 µL de Caldo Sabouraud Dextrose (SDB – Difco, USA) glicosado (8% glicose) mais GUAR (20 µL); ou CLOR (20 µL); ou PBS (20 µL). A microplaca foi incubada por 24 h a 37°C sob agitação contínua a 50 rotações por minuto (rpm) (Shaker NT712). Em seguida, foram realizadas duas lavagens com água destilada e leitura na leitora de microplacas a 405 nm. Para quantificar o biofilme, subtraiu-se o valor da DO convertido em transmitância (T) do valor do controle negativo (sem produção de biofilme) e seguiu a seguinte escala de interpretação: negativo (%T < 5), 1+ (%T 5 a 20), 2+ (%T 20 a 35), 3+ (%T 35 a 50), 4+ (%T ≥ 50).

2.5 Adesão em superfície de poliestireno

A capacidade de adesão em poliestireno foi determinada pela metodologia de Raut et al.(2010)⁵⁸ com algumas modificações.

Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados o

INOC (50 μ L; $1 - 2 \times 10^7$) mais GUAR (50 μ L); ou CLOR (50 μ L); ou PBS (50 μ L). A microplaca foi incubada por 90 min a 37°C sob agitação contínua a 50 rpm. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS para remoção de leveduras fracamente aderidas ou não aderidas à superfície da microplaca.

As leveduras aderidas foram então observadas em microscópio óptico de luz invertida (Olympus CK 40 – 20 X) e o número de células aderidas foi contado visualmente por uma única examinadora. Foram avaliados 20 campos diferentes da superfície de cada poço e o valor médio destes campos foi calculado, indicando assim a adesão da levedura.

2.6 Adesão em superfície de resinas compostas

O ensaio de adesão sobre superfícies de resinas compostas foi realizado de acordo a técnica de contagem das UFC, proposta por Samaranayake e MacFarlane(1980),¹⁸ com adaptações.

Corpos de prova foram confeccionados com três resinas compostas disponíveis comercialmente, uma nanoparticulada e duas micro-híbridas. Foram confeccionados três corpos de prova para cada grupo avaliado. Os compósitos, fabricantes e informações dos materiais estão apresentados na Tabela 1.

A resina composta foi inserida com uma espátula em uma matriz circular metálica, com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, apoiada em uma lâmina de vidro, com uma película de acetato interposta e comprimida manualmente sobre outra lâmina de vidro protegida por outra película de acetato, e fotoativada durante 40 s em ambos os lados com o fotopolimerizador LED Radian (SDI Dental Equipment Products - Australia). A intensidade de luz foi

medida anteriormente pelo radiômetro (Demetron Research Corp.), onde foi obtido o valor de 650 mW/cm².

Os corpos de prova esterilizados e hidratados foram colocados em poços de microplaca de 24 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark). Em cada poço, além do corpo de prova foram adicionados o INOC (500 µL; $1 - 2 \times 10^5$) mais GUAR (500 µL); ou CLOR (500 µL); ou PBS (500 µL). As microplacas foram incubadas por 60 min a 37°C sob agitação contínua a 50 rpm. Em seguida, os corpos de prova foram lavados três vezes com PBS para remoção de micro-organismos fracamente aderidos ou não aderidos, e transferidos para tubos de ensaio de vidro com PBS (2 mL) e pérolas de vidro (1g) (1 - 2 mm de diâmetro, Roni Alzi Scientific Glass). Foram agitados durante 1 minuto em agitador de tubos, para desprendimento das leveduras fortemente aderidas às superfícies da resina. Desta suspensão foi feita a inoculação em placas de Petri contendo SDA. As placas foram incubadas à 37°C por 18h e em seguida realizada a contagem visual do número de colônias. Os valores foram expressos pela média de células de *C. albicans* aderidas por mm².

2.7 Análise ultra-estrutural de *C. albicans* aderidas sobre superfície de resina composta e padrão de adesão através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

C. albicans foi analisada por MEV (Microscopia eletrônica de varredura Shimadzu SS-550 Superscan (Shimadzu Biotech, Japão) sobre corpos de prova de resinas compostas. Para tanto, foram realizados ensaios de adesão com as resinas compostas LLis® e Z350®, já que a resina Opallis® mostrou o mesmo padrão de adesão que a resina LLis®. Após 60 min de incubação a 37°

C em agitação contínua, os corpos de prova foram fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,2M pH 7,2) e mantidos à temperatura de 4°C por 24 h. Foram então, desidratados em série etílica crescente (80%, 90%, 95% e 100%) e levados ao ponto crítico utilizando CO₂ líquido (Bal-tec – CPD 030 Critical Point Dryer, Balzers, 40 Liechtenstein). Em seguida, foram fixados em suporte de alumínio e metalizados para obtenção de uma cobertura com filme de ouro (Shimadzu IC- 50 - Shimadzu Biotech, Japão). Os espécimes metalizados foram então, examinados por meio da MEV. As imagens de cada espécime foram capturadas em diferentes aumentos e regiões para a caracterização das células após exposição ao extrato de guaraná, solução de clorexidina e PBS.

2.8 Adesão em Células Epiteliais Bucais (CEB)

C. albicans foi cultivada em Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco, USA) suplementado com 50 mM de galactose e incubada a 37°C por 24 h. Em seguida, lavada três vezes em PBS e ressuspensa no mesmo tampão para obtenção e ajuste do inóculo.

Foram coletadas CEB da mucosa bucal de uma voluntária saudável e depositadas num tubo de ensaio contendo 10 mL de PBS. Essa suspensão foi lavada três vezes em PBS por centrifugação a 300 rpm por 10 min. O sedimento obtido foi ressuspensa em PBS para obtenção e ajuste da suspensão de CEB, segundo Irie et al. (2006).⁶¹

Em tubos de ensaio de plástico foram adicionados a suspensão de CEB (500 µL; 10⁵ cél/mL) e o INOC (250 µL; 1 - 2 x 10⁵) mais GUAR (250 µL); ou CLOR (250 µL); ou PBS (250 µL). Em seguida, os tubos foram incubados por 1

h a 37°C em agitação contínua a 70 rpm. As células da suspensão foram então, lavadas cinco vezes com PBS por centrifugação a 100 rpm por 10 min, obtendo-se um sedimento de CEB com ou sem leveduras aderidas e preparadas sobre lâminas de vidro. Foram fixadas com cristal violeta e coradas pela técnica de Papanicolau.

A capacidade de adesão foi analisada em microscópio óptico (Nykon, TMD, Nippon Kogaku Inc – 40 X). A avaliação foi realizada por uma única examinadora, em campos microscópicos que não apresentavam sobreposição de CEB ou artefatos de coloração. Foram consideradas aderidas as leveduras que apresentavam nítida interação com as CEB, evidenciadas por um halo claro ao seu redor. Foram realizadas duas contagens independentes. Primeiro, foram contadas 100 CEB e dentre estas, quantas tinham leveduras aderidas, obtendo-se assim, a porcentagem de CEB com e sem adesão. Na outra contagem, foram contadas quantas leveduras aderiram em cada CEB, onde foi obtida a média de leveduras aderidas por CEB. Todos os resultados foram expressos pelos valores médios entre as repetições de cada ensaio.

2.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA, testes Kruskal-Wallis e Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância foi fixado em 5% e os testes feitos pelo Statistical Package for Social Science – SPSS, versão 15.0.

3. Resultados

3.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

O extrato de guaraná não inibiu o crescimento de *C. albicans* na

concentração de 10 mg/mL, ocorrendo crescimento em todas as diluições testadas. A solução de clorexidina inibiu o crescimento das leveduras na concentração de 0,125%.

3.2 Hidrofobicidade de superfície celular (HSC)

C. albicans apresentou inicialmente um perfil hidrofílico. A Figura 1 mostra que embora não estatisticamente significativa, houve um aumento da porcentagem de células que migraram para o *n*-hexadecano após a exposição do extrato de guaraná ($p = 0,999$). Por outro lado, a solução de clorexidina provocou uma queda na HSC da amostra ($p = 0,999$).

3.3 Formação de biofilme

A exposição ao extrato de guaraná não provocou alteração na capacidade de produzir biofilme em 24 h. Tanto antes quanto após a exposição ao extrato de guaraná ocorreu a formação de 4+ de biofilme, quantidade máxima segundo os escores propostos por Shin et al. (2002).⁶¹ Por outro lado, após exposição à solução de clorexidina ocorreu menor formação de biofilme com valor de 2+.

3.4 Adesão em superfície de poliestireno

O número médio de leveduras aderidas antes da exposição ao extrato de guaraná foi de 171,55 (mín = 68; máx = 296); após a exposição ao extrato de guaraná este foi de 45,3 (mín = 20; máx = 72) e após a exposição de solução de clorexidina foi de 86 (mín = 50; máx = 128).

Assim houve diminuição da adesão de *C. albicans* em superfície de poliestireno, tanto após a exposição ao extrato de guaraná ($p < 0,001$), como após à solução de clorexidina ($p = 0,023$) (Figura 2).

3.5 Adesão em superfícies de resinas compostas

A exposição ao extrato de guaraná aumentou a adesão de *C. albicans* sobre todas as resinas testadas individualmente. Para as resinas Lis® e Opallis® este aumento não foi estatisticamente significativo ($p = 0,193$ e $0,578$ respectivamente), ao contrário da resina Z350® ($p = 0,042$). Comparando o comportamento das resinas compostas, foi observado que após a exposição ao extrato de guaraná, não houve diferença estatisticamente significativa na adesão de *C. albicans* entre a Lis® e a Opallis® ($p = 0,392$). Entretanto, ocorreram diferenças significativas entre Lis® e Z350® ($p < 0,001$) e entre Opallis® e Z350® ($p = 0,001$). Após a exposição à solução de clorexidina não ocorreu o crescimento de leveduras (Figura 3).

3.6 Análise da adesão de *C. albicans* sobre superfícies das resinas compostas através de MEV

As imagens demonstraram variações no crescimento de leveduras na superfície da resina composta antes e após a exposição ao extrato de guaraná, e entre as resinas compostas (Figura 4). Observou-se um padrão de auto-agregação das leveduras após exposição ao guaraná (Figura 5).

3.7 Adesão em CEB

Conforme a tabela 2, o extrato de guaraná provocou a diminuição da capacidade de aderência em CEB, tanto na porcentagem de células que tiveram leveduras aderidas (de 44 para 29,2) quanto no número médio de leveduras aderidas por célula (de 3,39 para 2,39) ($p < 0,001$). Da mesma forma, após a exposição à solução de clorexidina houve redução na

porcentagem de CEBs que tiveram leveduras aderidas (de 44 para 22,5) e no número médio de leveduras aderidas por CEB (de 3,39 para 2,32) ($p < 0,001$). A diferença observada no número médio de leveduras aderidas por célula entre o extrato de guaraná e solução de clorexidina, não foi estatisticamente significativa ($p = 0,958$). A Figura 6 demonstra a aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais, através de microscopia óptica.

4. Discussão

Os resultados obtidos no ensaio de adesão em superfície de poliestireno mostraram que a exposição ao extrato de guaraná e solução de clorexidina resultou na redução da capacidade de adesão de *C. albicans* de maneira estatisticamente significativa. Além disso, a adesão sobre superfícies de resinas compostas aumentou após a exposição ao extrato de guaraná e, significativamente para a resina nanoparticulada. Estes resultados podem estar relacionados com as características físico-químicas dos materiais, como diferenças na hidrofobicidade e na rugosidade superficial, as quais podem ter sofrido alterações após o contato com o extrato de guaraná, contribuindo para o aumento da adesão de *C. albicans*. Segundo Bollen et al.,⁵³ a rugosidade de superfícies duras intra-orais, como as de resinas compostas, possui relevante importância clínica no processo de retenção de micro-organismos. Características dos compósitos dentais, como sua composição química (matriz e materiais de preenchimento) também interferem na adesão de *C. albicans*.^{6,}
¹⁹ Bürgers et al.¹⁹ ao comparar 14 compósitos dentais, observaram um elevado potencial de *C. albicans* em aderir sobre a maioria destes materiais. No presente trabalho, a rugosidade de superfície dos espécimes de resina

composta foi controlada, pois as superfícies ficaram bastante lisas após o processamento entre duas placas de vidro, e assim, foi feita a opção em não realizar o polimento. Segundo Bollen et al.,⁵³ quando procedimentos de acabamento e polimento são considerados, diversos estudos demonstram que a própria compressão de um compósito contra uma matriz, já cria uma superfície muito lisa, fato observado com os espécimes do presente estudo. O controle foi realizado visual e artesanalmente, portanto passível de falhas, para melhor reproduzir a realidade do ambiente clínico. Já nas microplacas de poliestireno as possíveis falhas de superfície são minimizadas e controladas por um padrão industrial de controle de qualidade. Houve aumento significativo na adesão sobre a resina nanoparticulada em relação às demais após a exposição ao extrato de guaraná. É possível que as nanopartículas conferiram características físico-químicas próprias à superfície do nanocompósito, como citado anteriormente, podendo assim interferir na hidrofobicidade e capacidade de adesão por leveduras. Embora comparações diretas não possam ser feitas, fato semelhante foi observado no estudo de Takamya,⁵⁴ onde superfícies de (poli) metilmetacrilato na qual foram adicionadas nanopartículas de prata, ocorreu aumento da hidrofobicidade do nanocompósito, principalmente nos grupos onde foram adicionados uma maior concentração de nanopartículas.

O processo de adesão de *C. albicans* é complexo e envolve fatores biológicos e não biológicos. Variações na superfície das leveduras exercem um papel crítico no fenômeno de adesão.¹ Além disso, fatores como higiene bucal deficiente, baixo pH na cavidade bucal, dieta rica em carboidratos, superfície da célula fúngica constituída basicamente de nanoproteínas e β glicanos que

conferem características aniônicas aos fungos, a HSC fúngica, a energia livre de superfície do substrato envolvendo forças eletrostáticas de atração e repulsão, a rugosidade da superfície da resina composta interferem na adesão e colonização por *C. albicans* ^{1,6,7,19,23,55}

No presente trabalho, o ensaio de HSC revelou um comportamento hidrofílico inicial, ocorrendo um aumento na HSC após o contato com extrato de guaraná. A HSC contribui para interações hidrofóbicas entre as células e as superfícies e é considerada um fator importante para a adesão de *C. albicans* à superfícies inertes.²⁸ Panagoda et al.,⁵ encontraram correlação estatisticamente significativa entre HSC e a adesão de *C. albicans* nas células epiteliais bucais e nas superfícies de resina acrílica. Quando se analisa a HSC, deve ser considerado que é um processo dinâmico que pode ser modificado por vários fatores.⁵⁶ Embora a literatura mostre que leveduras hidrofóbicas sejam mais virulentas que as não hidrofóbicas,^{56,57} diversos estudos não encontraram correlação entre HSC e energia livre de superfície sobre a adesão de fungos,^{19,28,33,58-60} demonstrando que a HSC da célula sozinha não é suficiente para a atividade de adesão. Em nosso estudo, quando as leveduras foram incubadas com extrato de guaraná, mostraram uma visível agregação, também observada por Polaquini et al.³³ A auto-agregação de leveduras observadas pós a adição do extrato pode ser explicada pelo aumento da HSC. O ensaio por MEV do presente trabalho confirmou o padrão da adesão de *C. albicans* sobre as superfícies de resinas compostas antes e após a exposição ao extrato de guaraná.

A clorexidina é um agente antisséptico que possui efetiva atividade

antimicrobiana contra um largo espectro de micro-organismos, incluindo *Candida* sp.³⁴ Suas indicações mais frequentes são para o controle da placa bacteriana, prevenindo a cárie, gengivite e doença periodontal através da supressão dos micro-organismos que causam a doença nos casos em que o controle mecânico da placa (escovação e fio dental) não se mostrou eficaz.³⁴ No entanto, o uso contínuo da solução de clorexidina pode causar manchas no dorso lingual e esmalte dental, além de induzir mudanças no paladar e descamações na mucosa bucal, limitando seu uso por curtos períodos.⁶¹ Diversos estudos indicam que a clorexidina tem efeitos tóxicos em células humanas e na granulação dos tecidos⁶²⁻⁶⁴ e que, concentrações bem abaixo daquelas usadas na odontologia clínica tem sido relatadas como causa de injúrias, morte celular e inibição de síntese de proteínas em cultura de fibroblastos humanos.³⁴ Agentes antissépticos efetivamente matam micro-organismos, mas falham em remover o biofilme e assim, o crescimento de micro-organismos pode ocorrer ainda no biofilme preexistente.⁶⁵ Estratégias antimicrobianas em conjunção com agentes que não são letais aos micro-organismos, com diferentes mecanismos de ação, são de grande interesse para o controle dos biofilmes, tais como o uso de substâncias anti-adesão que inibam a adesão inicial dos micro-organismos.⁶⁵ Os resultados obtidos no ensaio de adesão em CEB mostraram que a exposição ao extrato de guaraná reduziu a adesão de *C.albicans*, tanto na porcentagem de CEB que tiveram leveduras aderidas, quanto no número de leveduras aderidas por CEB. A adesão em CEB representa um fato essencial na colonização microbiana e um evento chave na iniciação do processo patogênico.⁶⁶ Geralmente, os efeitos

benéficos atribuídos às plantas podem ser atribuídos a um ou mais fotoquímicos, incluindo antioxidantes, flavinas, e outras substâncias presentes.

⁴¹⁻⁴⁵ Embora o efeito do extrato de guaraná não possa estar relacionado a um componente específico, este estudo demonstrou uma ação anti-adesão do extrato de guaraná sobre superfície de poliestireno e CEB. Sugere-se que novos estudos sejam realizados para avalia-lo como possível componente de enxaguatórios bucais.

Outras pesquisas avaliando-se o efeito anti-adesão do extrato de guaraná e suas frações semi-purificadas sobre resinas compostas e outros materiais odontológicos, assim como a comparação com outros extratos vegetais seriam oportunas.

5. Conclusão:

Apesar do extrato de guaraná não ter provocado uma diminuição da adesão sobre superfícies de resinas compostas, demonstrou um efeito anti-adesão de *C. albicans* sobre superfície de poliestireno e CEB, indicando uma possível ação na prevenção de candidoses orais.

Referências

1. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses* 2006;**49**:80-4.
2. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:1200-8
3. Elguezabal N, Maza JL, Dorransoro S, Pontón J. Whole saliva has a dual role on the adherence of *Candida albicans* to polymethylmetacrylate. *Open Dent J* 2008;**2**:1-4.
4. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. *Oral Dis* 2008;**14**:138–43.
5. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS* 1998;**106**:736–42.
6. Panagoda GJ, Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; **44**:29-35.
7. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont* 2003; **12**:249-54.
8. Silva CRG, Melo KE, Leão MVP, Ruis R, Jorge AOC. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;**30**:300-5.

9. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000* 2009;**49**:39-59.
10. Conde-Rosa A, Amador R, Pérez-Torres D. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *P R Health Sci J* 2010;**29**:26-9.
11. Taur Y, Cohen N, Dubnow S, Paskovaty A, Seo SK. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:184–90.
12. Sant’Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP, et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;**97**:253-7.
13. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* 2002;**110**:601–10.
14. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;**16**:296-300.
15. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS* 1995;**103**:707–13.
16. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M, Yuen KY. Adhesion

- and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. J Med Microbiol 1994;**41**:250–58.
17. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. Infect Immun 1985;**47**:11–4.
 18. Samaranayake LP, MacFarlane TW. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch Oral Biol 1980;**25**:603-9.
 19. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Rosentritt M, Handel G, Hahnel S. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. Clin Oral Invest 2009;**13**:293–99.
 20. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003;**11**:30—6.
 21. Ellepola ANB, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. Arch Oral Biol 1998;**43**:879—87.
 22. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. Mycoses 2001;**44**:29-35.
 23. Souza RD, Mores AU, Cavalca L, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. Gerodontology 2009;**26**:157-61.
 24. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae Europ Journ Orthod 2004;**26**:623-29.

25. 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. *OOOOE* 2002;**94**:589-92.
26. Kamai Y., M. Kubota, Y. Kamai, T. Hosokawa, T. Fukuoka, S. G. Filler. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2002;**70**:5256-58.
27. Hazen KC, Wu JG, Masuoka J. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun* 2001;**69**:779–86.
28. Klotz SA. The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates *FEMS Microbiol Lett* 1994;**120**(3):257-62.
29. Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990;**48**:37-43.
30. 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**:448-55.
31. Godoy J, Bonfim-Mendonça PS, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Peralisi N et al. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *J Oral Pathol Med* 2012.
32. Elguezabal N, Maza JL, Pontó J Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis* 2004;**10**:81–633.

33. Polaquini, SRB, Svidzinski, TIE, Kemmelmeier, C, Gasparetto, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilme formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. Arch Oral Biol 2006;**51**:482-90.
34. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. Oral Dis 2001;**7**:11—7.
35. Castilho AR, Murata RM, Pardi V. Produtos naturais em odontologia. Rev Saúde 2007;**1**:11-9.
36. Groppo FC, Bergamaschi CC, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RHL, Andrade ED. Use of Phytotherapy in Dentistry. Phytother Res 2008;**22**:993–98.
37. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev bras Farmacogn 2008;**18**:472-508.
38. Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Rev Bras Farmacogn 2006;**16**:408-20.
39. Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BPFA. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. OOOOE 2007;**104**:709–16.
40. Seneviratne CJ, Wong RWK, Samaranayake LP. Potent anti-microbial activity of traditional Chinese medicine herbs against *Candida* species. Mycoses 2008;**51**:30-4.
41. Yamaguti-Sasaki E, Ito, LA, Canteli, VCD, Ushirobira, TMA, Ueda-

- Nakamura, T, Dias Filho BP, Nakamura, CV, Mello, JCP de. Antioxidant capacity and In vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensend tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 2007; **12**:1950-63.
42. Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulences factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemoter* 2006;**58**:942-49.
43. Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *Eur Food Res Technol* 2007;**225**:569-77.
44. Pelozo, MIG, Cardoso, MLC, Mello, JCP. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Braz Arch Biol Technol* 2008;**51**:447-51.
45. Otobone, FJ, Sanches, AC, Nagae, RL, Martins, JVC, Obici, S, Mello, JCP et al. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) ducke] on cognitive performance in morris water maze in rats. *Braz Arch Biol Technol* 2005;**48**:723-28.
46. Otobone FJ, Sanches ACC, Nagae R, Martins JVC, Sela, VR, Mello JCP de, Audi, EA. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 2007;**21**:531-53.
47. Mello JCP, Audi EA. Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke). 2002, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI 0006638-9, data de depósito: 28/11/2000, título: "Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke)".
Instituição(ões) financiadora(s): Universidade Estadual de Maringá.

48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
49. Raut J, Rathod V, Karuppaiyl SM. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2010;**51**:131–6.
50. Hazen Kc, Hazen BW: A polystyrene microsphere assay for detecting surface hidrofobicity variations within *Candida albicans* populations. *J Microbiol Methods* 1987; **6**:289-99.
51. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:1244-8
52. Irie MMT, Lopes Consolaro ME, Aparecida Guedes T, Donatti L, Valéria Patussi E, Estivalet Svidzinski TI. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 2006;**20**:195–203.
53. Bollen, CML, Lambrechts P, Quiryneen 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**:258-69.
54. Takamiya AS. Adição de nanopartículas de prata ao poli (metil metacrilato):análise microbiológica. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010.
55. Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* Biofilm Formation. *J Dent Res* 2009;**88**:105-15.
56. Anil, S., Ellepola, A. and Samaranayake¹, L. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis* 2001;**7**:119–22.
57. Hazen KC, Hazen BW. Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;**107**:83–7.
58. Pereira 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**:308–10.
59. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont* 2005;**18**:392–8.
60. Gasparetto A. Virulência de amostras orais de *Candida albicans*: novas abordagens metodológicas no estudo da produção de exoenzimas, aderência, formação de biofilme e influência de campos magnéticos. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2004.

61. Flötra L, Gjermo P, Rölla G, Waerhaug J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Europ J Oral Scienc* 1971;**79**:119–25.
62. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels *Intern Endodont J* 2010; **43**:430–5.
63. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clinical Oral Investigations* 2007;**11**:155–64.
64. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro* 2008;**22**:308–17.
65. Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci* 2003;**111**:144–8.
66. Grimaudo NJ, Nesbitt WE. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol Immunol* 1997;**12**:168-73.

Legenda de Figuras

Figura 1 - Influência do extrato de guaraná sobre *C. albicans* considerando o perfil de hidrofobicidade em superfície celular (HSC). Teste Anova (Kruskal-Wallis)

Figura 2 - Perfil de adesão de *C. albicans* sobre superfície de poliestireno após exposição ao PBS, extrato de guaraná e clorexidina. Teste Anova (Kruskal-Wallis)

Figura 3 - Perfil de adesão em superfície das resinas compostas Llis®, Opallis® e Z350® após exposição ao PBS e extrato de guaraná. Teste Anova (Tukey's)

Figura 4 - Imagens de MEV demonstrando o padrão da adesão de células de *C. albicans* antes e após a exposição ao extrato de guaraná. **A e B)** resina composta Llis® antes e após a exposição ao guaraná; **C e D)** resina composta Z350® antes e após a exposição ao guaraná

Figura 5 - Imagens de MEV - Crescimento em grumos após exposição ao guaraná. **A) e C)** resina Llis® **B) e D)** resina Z350®

Figura 6 - Demonstração da aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais, através de microscopia óptica

Legenda de Tabelas

Tabela 1 - Características e propriedades físicas das resinas compostas testadas

Tabela 2 - Perfil de aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais após exposição ao PBS, extrato de guaraná e solução de clorexidina

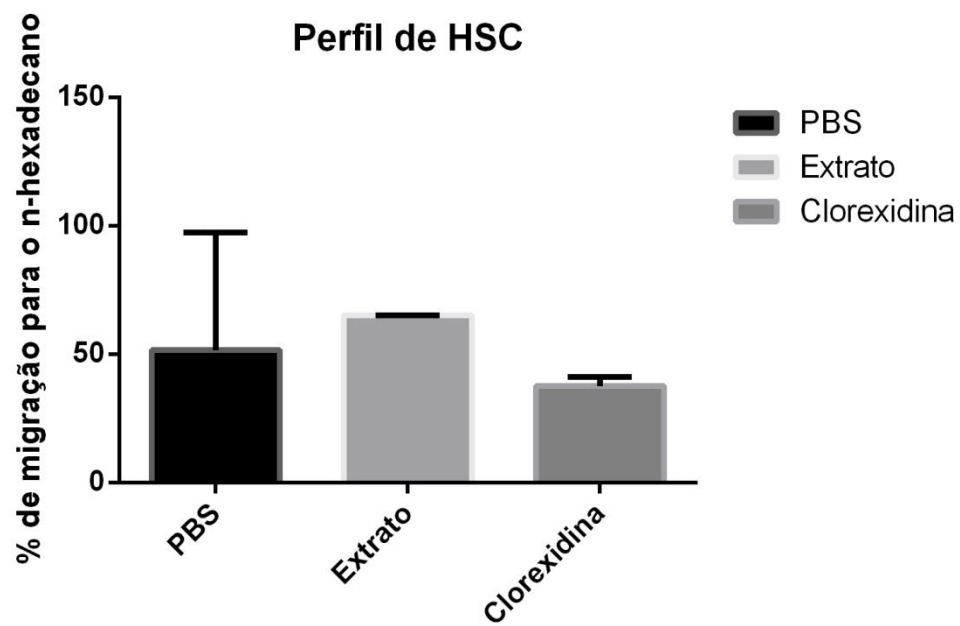


Figura 1 - Influência do extrato de guaraná sobre *C. albicans* considerando o perfil de hidrofobicidade em superfície celular (HSC). Teste Anova (Kruskal-Wallis)

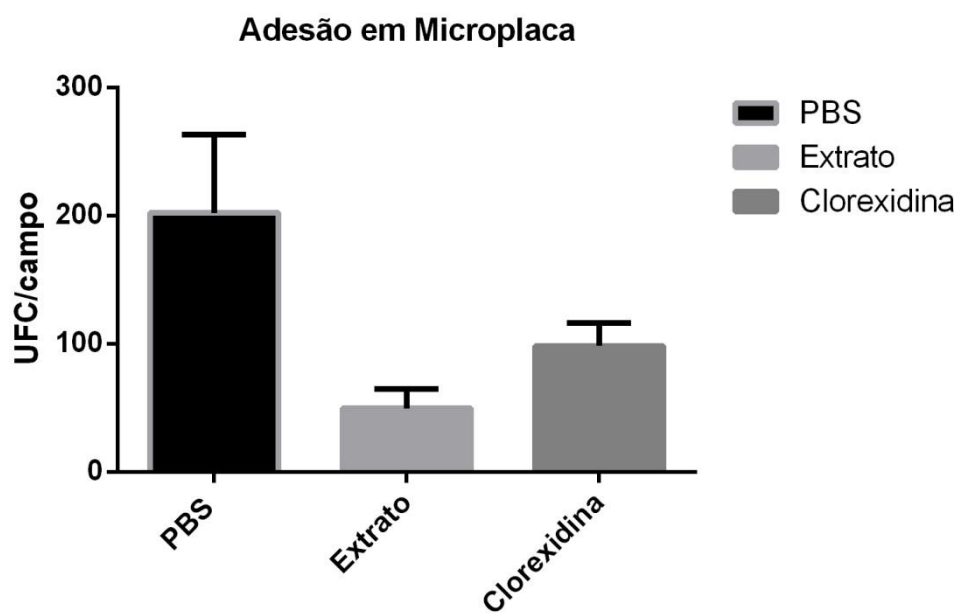


Figura 2 - Perfil de adesão de *C. albicans* sobre superfície de poliestireno após a exposição ao PBS, extrato de guaraná e clorexidina. Teste Anova (Kruskal-Wallis)

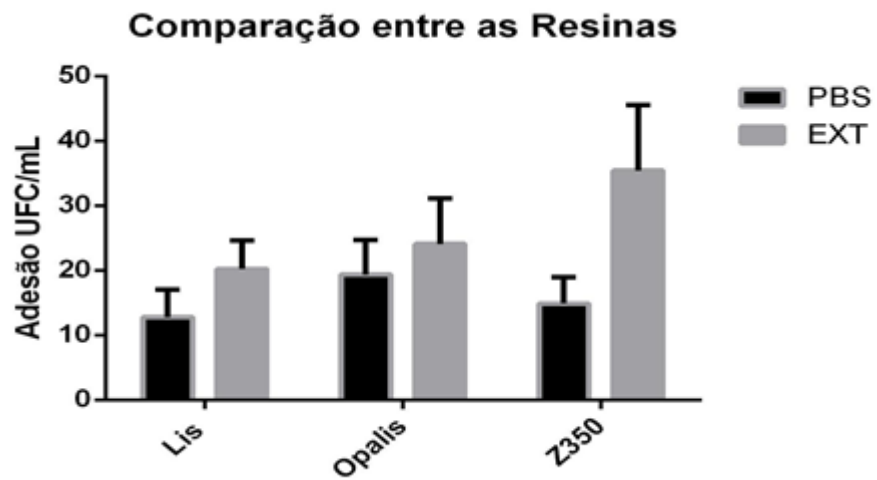


Figura 3 - Perfil de adesão em superfície das resinas compostas Lis®, Opallis® e Z350® após exposição ao PBS e extrato de guaraná a 10 mg/mL. Teste Anova (Tukey's)

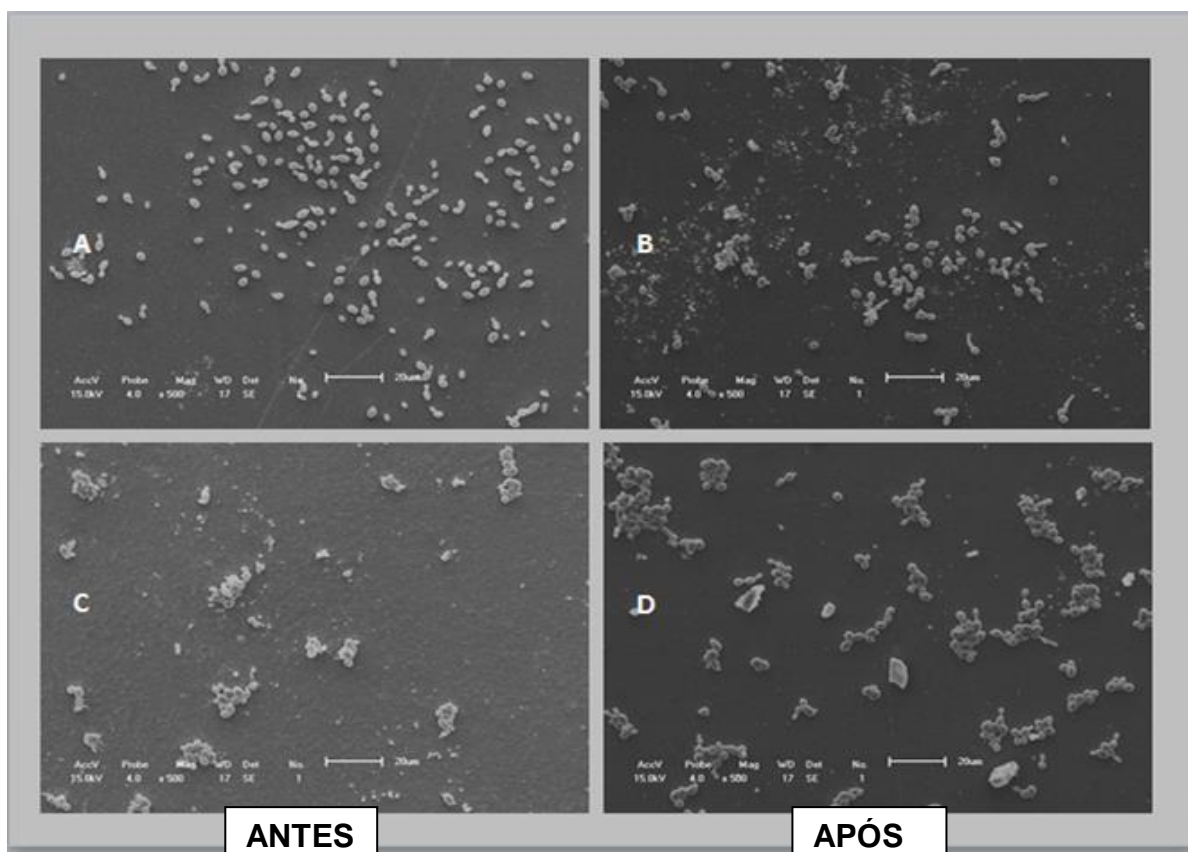
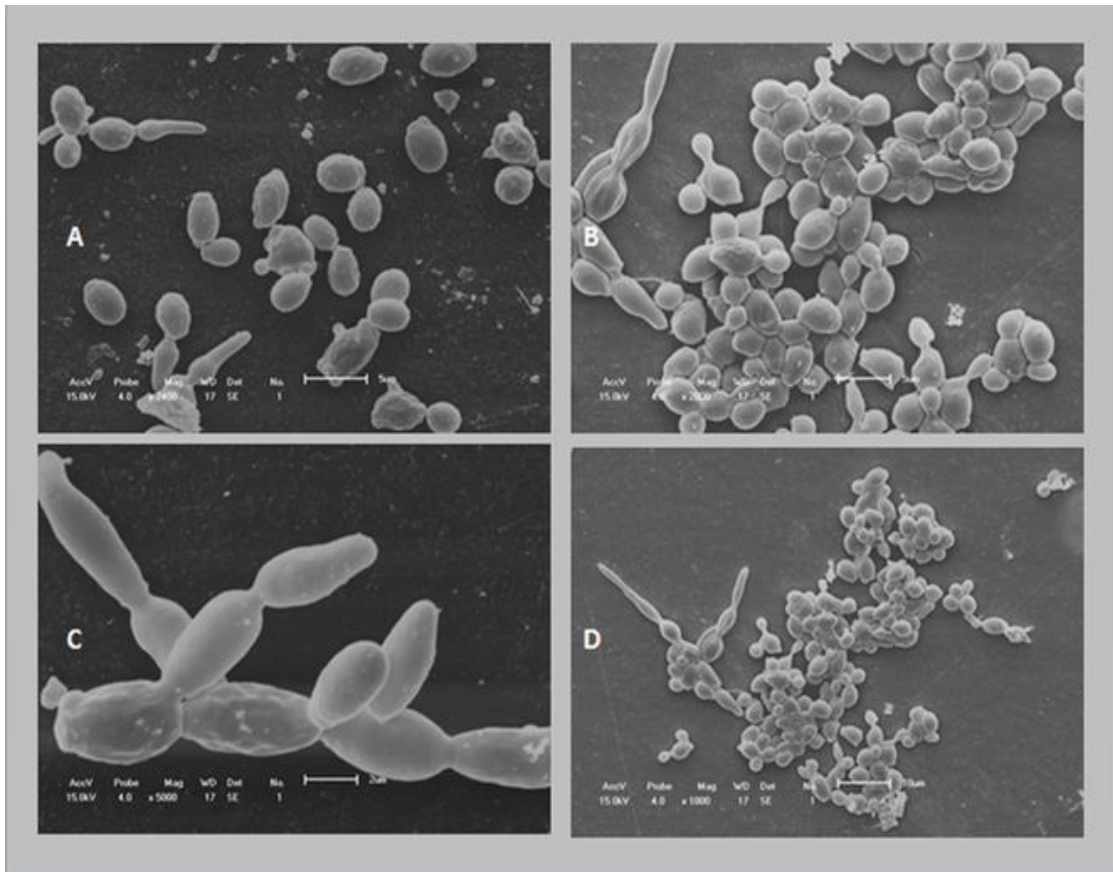


Figura 4 - Imagens de MEV demonstrando o padrão da adesão de células de *C. albicans* antes e após exposição ao extrato de guaraná. **A)** e **B)** resina composta Llis® antes e após exposição ao extrato de guaraná (500 x); **C)** e **D)** resina composta Z350® antes e após exposição ao extrato de guaraná (500 x).



Diferentes aumentos

Figura 5 - Imagens de MEV. Auto-agregação das leveduras após exposição ao extrato de guaraná. **A)** e **C)** resina composta Llis® (2400 x e 5000 x); **B)** e **D)** resina composta Z350® (2000 x e 1000 x).

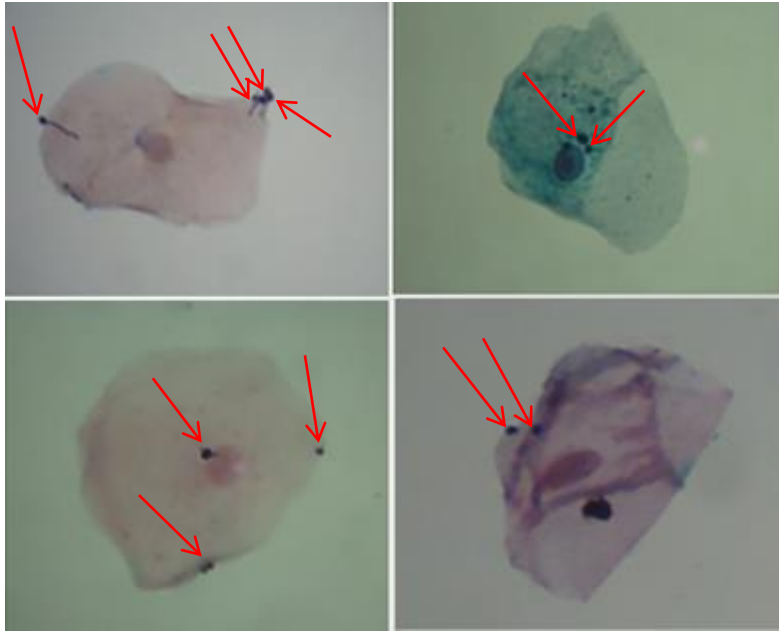


Figura 6 - Demonstração da aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais, através de microscopia óptica (40 x)

Tabela 1 - Características e propriedades físicas das resinas compostas testadas

Resinas	Fabricante	Tipo	Faixa	Tamanho médio (μm)	Vol. Carga em peso (%)	Vol. Carga inorgânica (%)
Llis®	FGM	micro-híbrida	40nm-3 μm	0,8	77,5-78,5	56-59
Opallis®	FGM	miicro-híbrida	40nm-2 μm	0,5	78,5-79,5	57-58
Z350®	3M ESPE	nanopartícula	4nm-20nm	0,6-10	78,5	63,3

Tabela 2 - Perfil de aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais após exposição ao PBS, extrato de guaraná e solução de clorexidina

	%	N°±DP	p
PBS ¹	44,0	3,39±1,66	$p^{1,2} < 0,0001$
Guaraná ²	29,2	2,39±1,11	$p^{1,3} < 0,0001$
Clorexidina ³	22,5	2,32±1,44	$p^{2,3} = 0,958$

Testes de Tukey e ANOVA

% = porcentagem de células que tiveram leveduras aderidas

N° = número médio de leveduras aderidas por célula

DP= desvio padrão

p = valores de p de N°

APÊNDICES

APÊNDICE A - *C.albicans* e condições de crescimento

C. albicans (cepa padrão ATCC 90028 – Laboratório de Micologia Médica – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil) (Figura 1) armazenada à temperatura de -4°C foi reativada em SDB ou Caldo YPD a 25°C por 24 h. (Figura 2). Após foi incubada em SDA ou ágar YPD por 24 h a 37°C (Figura 3).

Para os ensaios de Hidrofobicidade de Superfície Celular (HSC), adesão em superfícies de poliestireno e resinas compostas e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizado o YPD como meio de cultura e para os ensaios de capacidade de formação de biofilme e adesão em células epiteliais bucais (CEB) foi utilizado o SDA

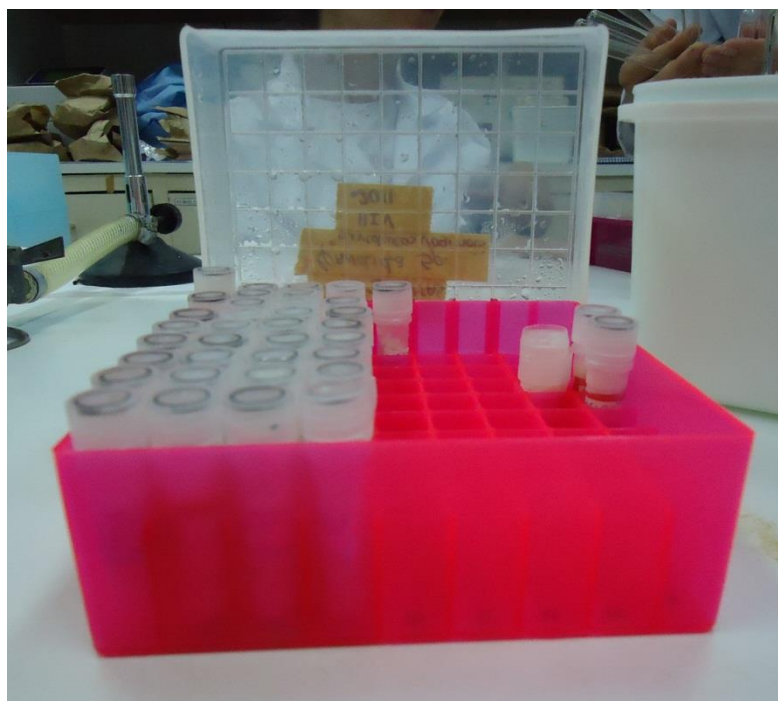


Figura 1 – Cepa de *C. albicans* (ATCC 90028)



Figura 2 – Preparo da cepa de *C. albicans* para ser reativada a 25°C por 24h

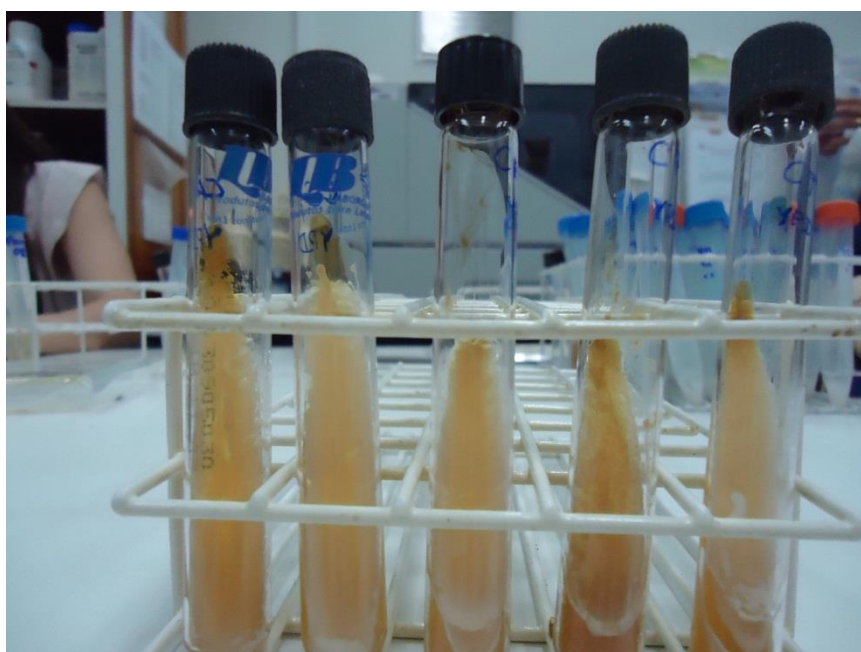


Figura 3 – Crescimento das colônias de *C. albicans* após cultivo de 24 a 37°C.

A partir de uma alçada da colônia isolada, foi feita uma suspensão em tubo de ensaio contendo PBS, ajustando a concentração a 10^5 ou 10^7 cél/mL ou cél/campo, requerida para cada experimento, com hemocitômetro tipo Neubauer

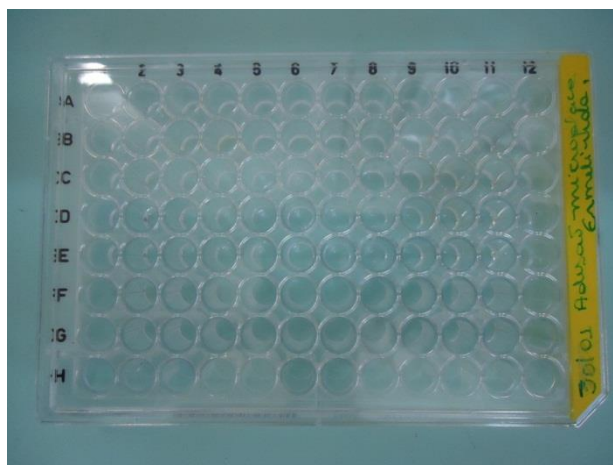


Figura 4 – Microplaca de poliestireno de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) utilizada nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Hidrofobicidade de Superfície Celular (HSC), Formação de Biofilme e Adesão em superfície de poliestireno

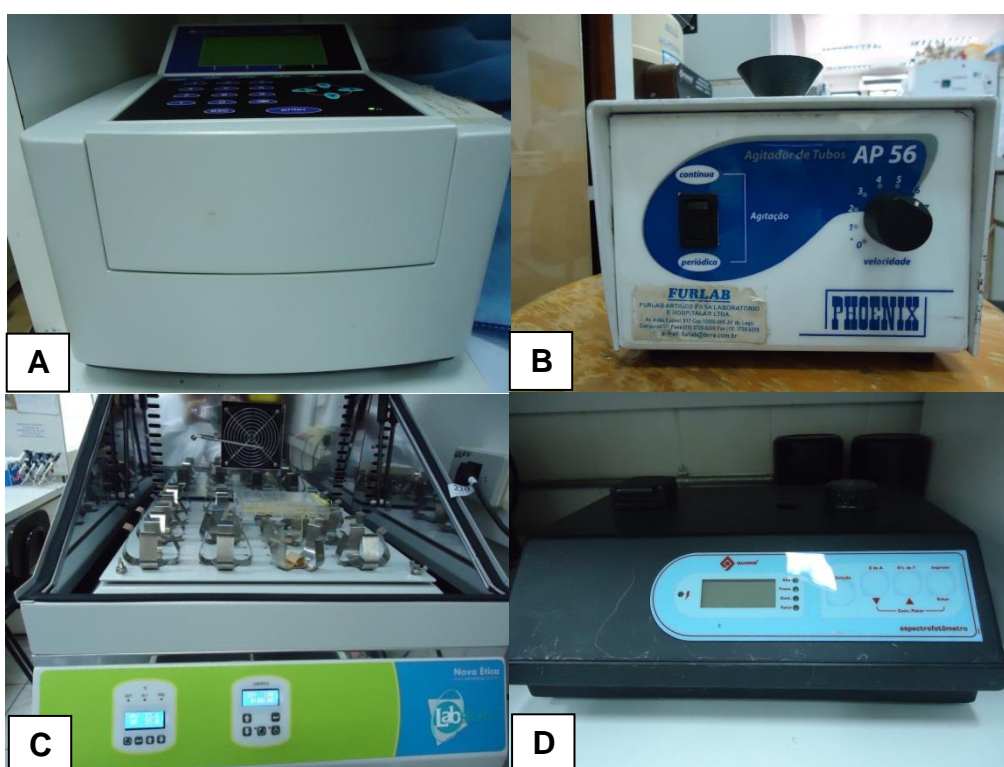


Figura 5 – Equipamentos utilizados nos ensaios: **A)** Leitora de microplaca (Expert plus – ASYS, UK) **B)** Agitador de tubos (Vórtex AP56 - Phoenix, Brasil); **C)** Incubadora (Shaker NT712); **D)** Espectrofotômetro (Baush & Lomb)

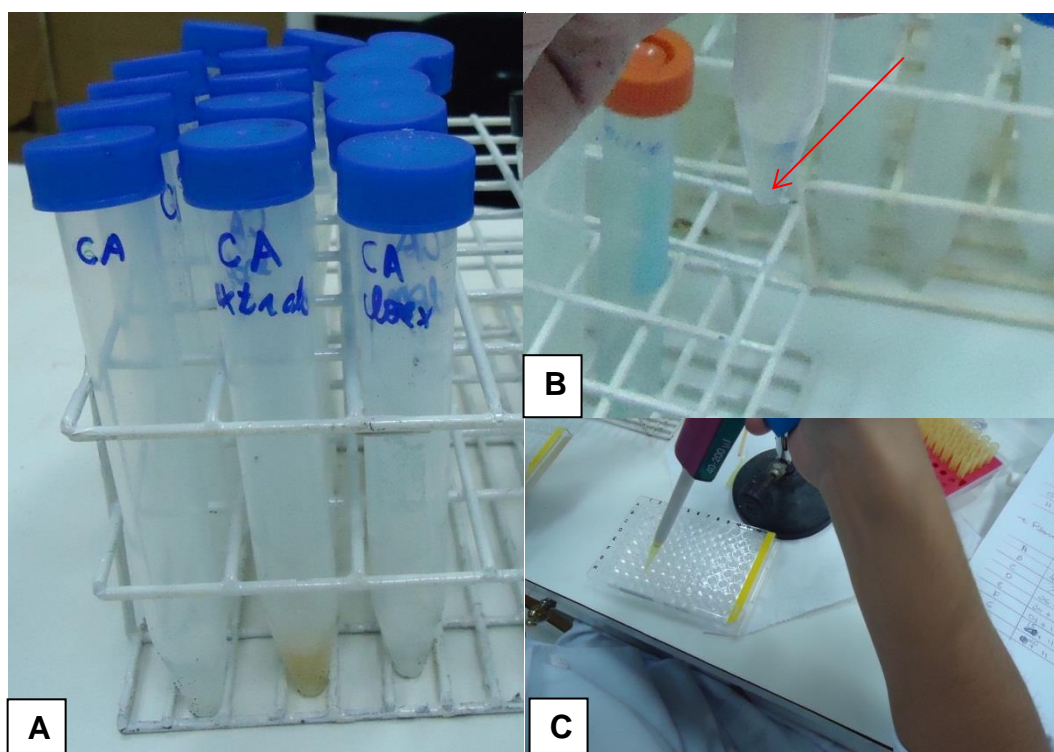
APÊNDICE B - Ensaio de Hidrofobicidade de superfície celular (HSC):

Figura 6 – A) Tubos em repouso após adição do n-hexadecano; **B)** e **C)** retirada da fase aquosa (esta fase deposita-se abaixo de uma fase turva) e pipetada para microplaca de 96 poços

APÊNDICE C - Adesão em superfície de poliestireno



Figura 7 – Microscópio óptico de luz invertida (Olympus CK 40) usado para contagem de UFC/campo do ensaio de adesão em superfície de poliestireno

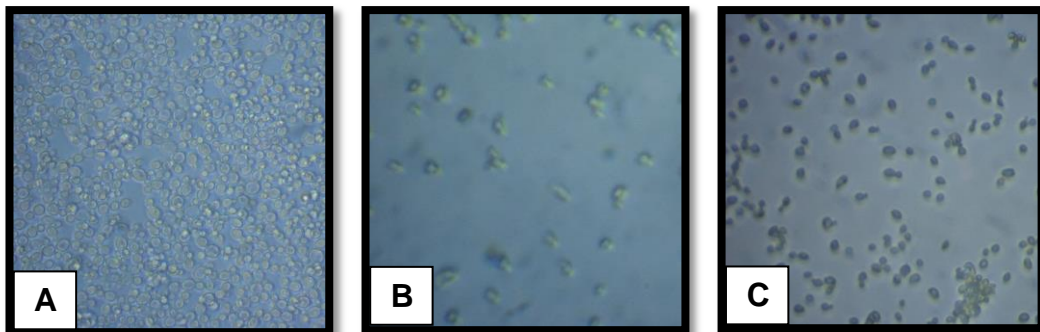


Figura 8 – A) B) *C. albicans* antes e após a exposição ao extrato de guaraná e C) após exposição à solução de clorexidina (20 X)

APÊNDICE D - Adesão em superfícies de resinas compostas

Materiais, dispositivos e aparelhos utilizados



Figura 9 – Resinas compostas Llis®, Opallis® e Z350® usadas para o ensaio de adesão em superfície de resinas compostas

Para obtenção dos corpos de prova foi utilizada uma matriz metálica medindo 1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura. A resina composta foi condensada no interior da matriz e interposta entre duas lâminas de vidro protegidas por matriz de acetato (película de retroprojeter) e foi fotoativada com polimerizador LED Ralii (SDI Dental Equipment Products – Australia) por 40 s em ambos os lados (Figuras 11 e 12).

Os espécimes foram autoclavados em tubos de plástico contendo água destilada e mantidos hidratados até o momento do ensaio.

Uma microplaca de poliestireno de 24 poços foi utilizada para o ensaio. (Figura 13).

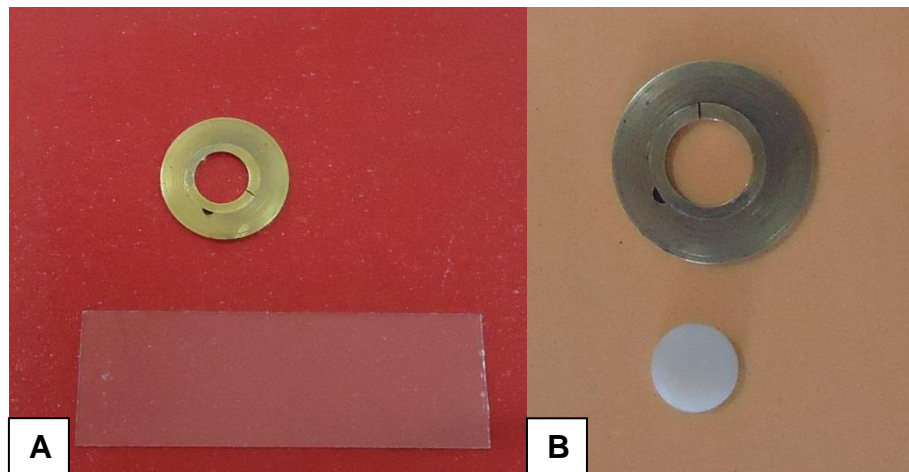


Figura 10 – A) Matriz utilizada para confecção dos corpos de prova de resina composta; **B)** Corpo de prova de resina composta



Figura 11 – A) Aparelho fotopolimerizador LED; **B)** Matriz com resina composta interposta com duas lâminas de vidro protegidas com película de retroprojeto

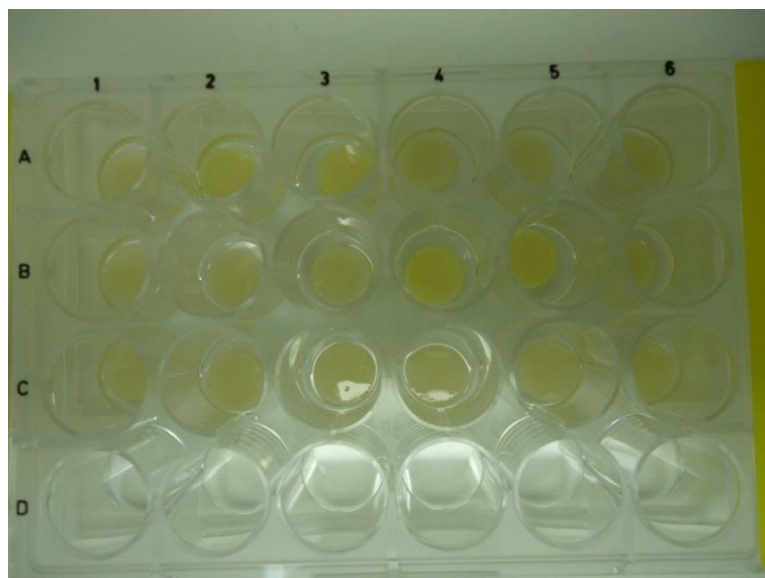


Figura 12 – Microplaca de 24 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) com corpos de prova de resina composta

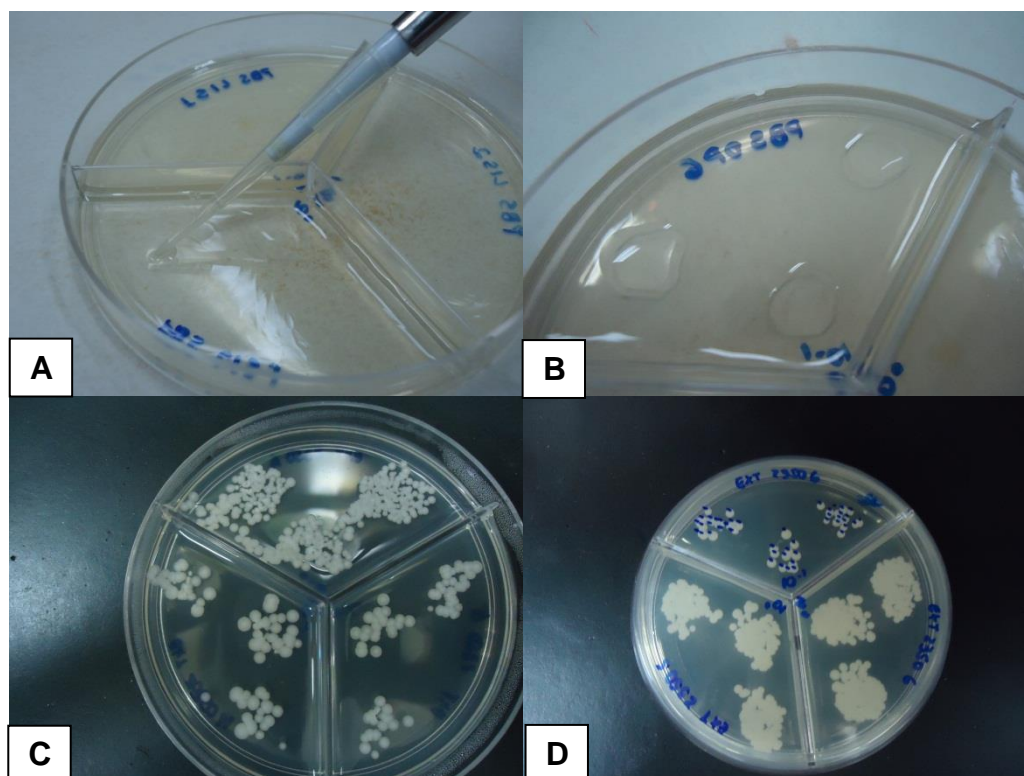


Figura 13 – **A e B)** inóculo sendo inserido em gotas em SDA; **C e D)** Após 18 h de incubação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e contagem das UFC

APÊNDICE E - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O ensaio foi feito apenas com as resinas LLis® e Z350®. O procedimento foi semelhante ao ensaio de adesão em resina composta. Após 60 minutos de incubação a 37°C em agitação contínua, os corpos de prova foram lavados três vezes com PBS e imersos em solução fixadoras de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,2M pH 7,2) e mantidos à temperatura de 4°C por 24 h. Então, foram novamente lavados em PBS por 3 períodos de 5 minutos cada. A desidratação dos espécimes foi realizada com imersões sucessivas em concentrações seriadas de álcool 80%, 90% e 95% por 10 minutos e duas imersões em álcool 100% por 10 minutos e levados ao ponto crítico utilizando CO² líquido (Bal-tec – CPD 030 Critical Point Dryer, Balzers, 40 Liechtenstein). Após a fixação e desidratação os espécimes foram fixados com fita dupla face em *stubs* (suporte de alumínio) e submetidos à metalização áurica utilizando um metalizador (Shimadzu IC- 50 - Shimadzu Biotech, Japão) para tornar a amostra condutora (1KV, 150Ap). Os espécimes metalizados foram, então, examinados por meio da MEV (Shimadzu SS-550 Superscan (Shimadzu Biotech, Japão)).

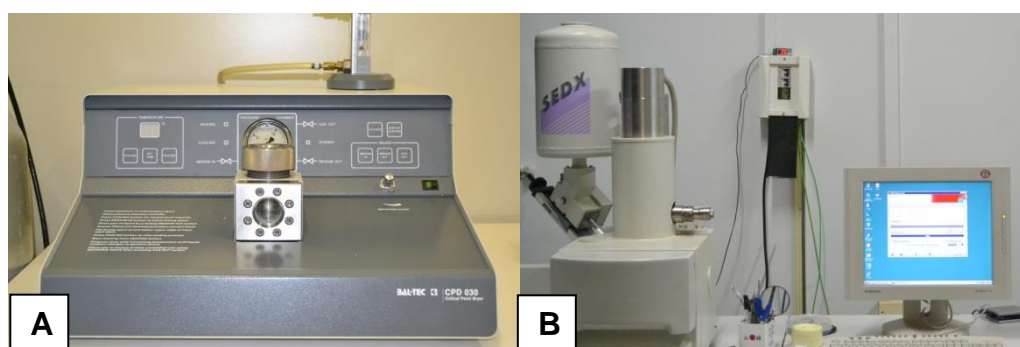


Figura 14 – A) Aparelho de ponto crítico; **B)** Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

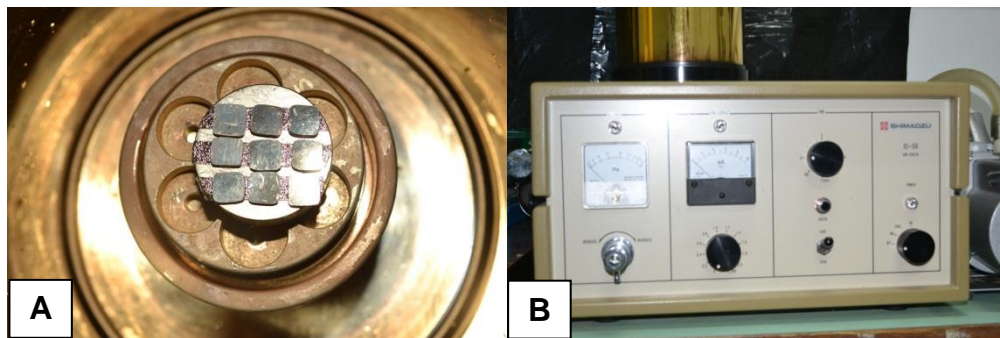


Figura 15 – A) espécimes de resina composta após recobrimento de camada de ouro; **B)** Aparelho metalizador utilizado para aurificação dos corpos de prova

ANEXO

ANEXO A – Normas para publicação

Archives of Oral Biology

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

Online submission of papers

<http://ees.elsevier.com/aob>

Submission and peer review of all papers is now conducted entirely online. Authors are guided stepwise through the entire process, and can follow the progress of their paper. The system creates a PDF version of the submitted manuscript for peer review, revision and proofing. All correspondence, including the editors' decision and request for revisions, is conducted by e-mail. Authors requesting further information about online submission should follow the tutorial, at <http://ees.elsevier.com/aob>.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Each manuscript must be accompanied by a statement signed by all authors that the manuscript in its submitted form has been read and approved by them. Authors must supply details of related papers submitted or recently published elsewhere. Submissions lacking this documentation will not be reviewed until it is supplied.

Authors are invited to suggest up to three referees they consider suitable to review their submission. The suggested reviewers should not have collaborated with the authors in the last 5 years. Full postal and email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilize these suggestions.

Authorship

All authors should have made substantial and material contributions to the paper. These would include the individuals responsible for the conception and design of the experiments and the interpretation of data. If the work was conducted using non-institutional grant funds the Principal Investigator on the funded grant should be included in the authorship. Individuals who gave purely technical help or advise, for example, on statistical tests or provided materials such as cell lines and antibodies should be included in the Acknowledgements. 'Guest' authors are unacceptable. The Acknowledgements should also include the source of the funds used and the Principal Investigator to whom they were awarded. If the manuscript has four or more authors listed, a letter describing the contribution of each should be included. Submissions lacking this documentation will not be reviewed until they are supplied.

Conflict of interest

The potential for conflict of interest exists when an author (or the author's institution), has financial or personal relationships that may influence his or her actions. Authors are specifically asked to reflect on financial conflicts of interest (such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria and paid expert testimony) as well as other forms of conflict of interest, including personal, academic and intellectual issues. At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships that could influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest a statement confirming such should be included

Ethics

Studies on human beings.

Such studies submitted to Archives of Oral Biology should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. The declaration

was adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989 (www.wma.net/e/policy/b3.htm). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. A copy of the institutional approval should be included. Submissions lacking these documents will not be reviewed until they are supplied. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Studies on animals.

The experimental procedures and care of animals should be in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (<http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>). The authors must state that animal care was in accordance with both these and institution guidelines. Signed documents of approval by institutional committees should be included as well as a statement from the authors that the study met the standards described in the European Convention. Submissions lacking these documents will not be reviewed until they are supplied.

Copyright

Accepted papers become the copyright of the Journal and are accepted on the understanding that they have not been published, are not being considered for publication elsewhere and are subject to editorial revision. If papers closely related to the submitted manuscript have been published or submitted for publication elsewhere, the author must state this in their cover letter. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Scientific Standards

The aim of Editors and referees is to maintain a high standard of scientific communication. Normally papers are assessed by two referees selected by the Editor, and decisions regarding acceptance are based mainly upon the advice of the referees. Where appropriate, the referees' views are forwarded to the authors for their consideration. Authors may occasionally consider referees' suggestions to be ill-conceived but if their text is misunderstood by referees it is likely to be misunderstood by readers of the journal.

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Manuscript Preparation

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal, English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be British or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods, Results or Findings, Discussion.

Authors will gain much assistance by consulting: Council of Biology Editors Style Manual Committee. Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th edition. New York: Cambridge University Press, 1994.

We suggest that authors consider using a language editing service to improve the English language usage and quality of a paper. A number of language editing companies will provide their services to our authors at competitive rates. Please follow this link for further details <http://elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languageediting/>. The editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the Journal's standards of clarity and conciseness.

General

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 10 or 12 points. The corresponding author should be identified (include a fax number and email address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The

corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Title page

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Received/accepted dates

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor. An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

Discussion

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

References

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to Index Medicus, or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. Arch Oral Biol 2004;49(2):149-154.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Units and symbols

In general, *Archives of Oral Biology* will use the recommended SI (Système Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm³ and ml³ in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology

Abbreviations

As *Archives of Oral Biology* is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'.

Numbers, measurements and statistics.

Numbers one to nine are spelled out unless they are measurements (e.g. 5 ml). Numbers greater than nine are spelled out if they begin a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ or ml per h.

Drugs

These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparation, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, London, UK).

Illustrations

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching).

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on www.elsevier.com/artworkinstructions. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

General: Information relating to the preferred formats for artwork and illustrations may be found at www.elsevier.com/authors. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate page.

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome. Please note that figures supplied in colour will appear online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Begin each table on a separate page. Footnotes to tables should be typed below the table and referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

Revised manuscripts

Frequently authors are required to submit revised versions of manuscripts in the light of reports from expert reviewers and editorial comments. Revised manuscripts must clearly show revisions and authors must clearly indicate the positions of revisions in a covering letter that addresses the concerns of reviewers/ editors.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author which they are requested to correct and return within **48 hours**. Only minor corrections are acceptable at this stage. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post. Elsevier now sends PDF proofs that can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemregs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting the line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a

watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles please visit www.elsevier.com/authors. This website provides information on article submission as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Further questions may be directed to the journal editorial office: *Archives of Oral Biology*, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK. Email: aob@elsevier.com