



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

MAYRA MACÊDO DE AQUINO

AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE, POROSIDADE E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM RESINAS PARA BASE PRÓTESE REMOVÍVEL,
ATRAVÉS DA RUGOSIMETRIA E TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA
ÓPTICA

Recife

2018

MAYRA MACÊDO DE AQUINO

AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE, POROSIDADE E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM RESINAS PARA BASE PRÓTESE REMOVÍVEL,
ATRAVÉS DA RUGOSIMETRIA E TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA
ÓPTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof Dr. Anderson S. L. Gomes

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Mota

Recife

2018

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Susyleide Brito, CRB4 - 1141

A657a Aquino, Mayra Macêdo de.
Avaliação da rugosidade, porosidade e formação de biofilme em resinas para base prótese removível, através da rugosimetria e tomografia de coerência óptica / Mayra Macêdo de Aquino. – 2017.
72 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Anderson S. L. Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2018.
Inclui referências e anexos.

1. Resinas. 2. Tomografia de Coerência Óptica. 3. Biofilme. I. Gomes, Anderson S. L. (Orientador). II. Título.

617.692 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2019-045)

MAYRA MACÊDO DE AQUINO

AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE, POROSIDADE E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM RESINAS PARA BASE PRÓTESE REMOVÍVEL,
ATRAVÉS DA RUGOSIMETRIA E TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA
ÓPTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para o obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada.

Aprovada em: 27/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho àqueles que nunca me desampararam, meus pais, Paulo e Aparecida. Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela força pra seguir nessa caminhada.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, por me proporcionar a possibilidade de continuar minha formação profissional de maneira tão enriquecedora.

Agradeço aos meus pais, por todo esforço e dedicação investidos na minha formação. Além do amor incondicional!

Às minhas irmãs, Ana Cláudia e Maysa, pela parceria eterna e pelo incentivo, não só durante esta jornada, mas por toda a vida!

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Anderson e Prof^a. Cláudia, pelo acolhimento desde o primeiro dia, pela disponibilidade, pelo respeito estabelecido na nossa relação e por todo ensinamento e crescimento durante esses dois anos!

Aos amigos do Laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física, que me ajudaram e me ensinaram um pouco daquilo que conheciam, enriquecendo a minha pesquisa!

Agradeço à Prof^a. Patrícia e João Paulo, por me acolherem e me inserirem no mundo da Microbiologia com tanto amor e paciência!

Aos amigos da FOP-UPE, Bruno Casado e Oscar, pela doação de seu tempo e de seus materiais de trabalho para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Agradeço a Silvio, protético da FOP-UPE, por ter me acompanhado e me ajudado durante a fase laboratorial protética do meu trabalho.

Aos Professores da Pós-Graduação por toda dedicação com a docência e pelos ensinamentos transmitidos ao longo desses anos. Aos funcionários da Pós-Graduação, Oziclere, Tamires e D. Tania, obrigada pela paciência!

À minha turma de Mestrado, por ter ganhado verdadeiros amigos, onde os interesses coletivos estão sempre acima dos pessoais, nos fazendo mais fortes e unidos!

À minha eterna dupla de faculdade, Aila, por todo incentivo e apoio!

Aos meus amigos, sempre presentes.

Obrigada!

RESUMO

A colonização de microrganismos na superfície das próteses aumenta a predisposição dos pacientes ao desenvolvimento de doenças. Busca-se assim, encontrar meios de diagnóstico que subsidiem o diagnóstico clínico. O objetivo do trabalho foi avaliar a rugosidade, porosidade e adesão de microrganismos de colônia mista em resinas para base de próteses removíveis. Como foram avaliadas 2 marcas comerciais de resina acrílica (Lucitone 550[®]; VipiCril Plus[®]) e de reembasamento (Coe-Comfort[®]; Soft-Comfort[®]), estas dividiram-se em quatro grupos (n=10) sendo polimerizadas e polidas conforme as orientações dos respectivos fabricantes. As amostras foram submetidas à rugosimetria por contato antes e depois do polimento; bem como ao escaneamento por OCT antes e 96h após a inoculação com *Candida albicans* e *Streptococcus aureus*. As imagens de OCT foram compostas por 2000 colunas e 512 linhas, obtidas a partir de um modelo comercial, Callisto SD-OCT (Thorlabs, EUA), operando em 930 nm de comprimento de onda central e 7 µm de resolução axial no ar. Dados de porosidade foram obtidos a partir de imagens do OCT processadas pelo programa Matlab. Observou-se que os valores de rugosidade das resinas diminuíram significativamente após o polimento, com exceção da resina Coe-Comfort. A resina Soft-Comfort apresentou os menores valores de rugosidade e os maiores de porosidade. Na avaliação qualitativa do biofilme, utilizando o OCT, observou-se diferenças nas imagens realizadas antes e depois da inoculação com microrganismos. Estas diferenças sugerem absorção de fluídos pelas resinas e presença de biofilme. Dessa maneira, conclui-se que os valores de rugosidade são melhorados após o polimento; não há correlação entre os valores de rugosidade e porosidade; e o OCT mostra-se como uma técnica viável para visualizar biofilme em ambos os tipos de resina.

Palavras-chave: Resina acrílica. Resina reembasadora. Tomografia de Coerência Óptica. Biofilme.

ABSTRACT

The colonization of microorganisms on the surface of a prosthesis increases the predisposition of patients to the development of diseases. It is sought, therefore, to find means of diagnosis that support the clinical diagnosis. To evaluate the roughness, porosity and adhesion of colony microorganisms in resins for removable dentures. Two commercial brands of acrylic resins (Lucitone 550®, VipiCril Plus®) and relining (Coe-Comfort®; Soft-Confort®) were used, divided into four groups (n = 10), polymerized and polished according to the orientations of their manufacturers. The samples were subjected to rugosimetry by contact before and after the polishing; also were subjected to the OCT before and after inoculation with *Candida albicans* and *Streptococcus aureus*. OCT images were composed of 2000 columns and 512 lines from a commercial model, Callisto SD-OCT (Thorlabs, USA), operating at 930 nm of central wavelength and 7 µm of axial resolution in the air. Comparison data were taken from OCT images processed by the Matlab program. The results showed that the roughness values of the resins decreased significantly after polishing, except for Coe-Comfort resin. Soft-Comfort resin presented the lowest values of roughness and the highest values of porosity. In the qualitative evaluation of the biofilm, using OCT, differences were observed in the images made before and after inoculation with microorganisms. These differences suggest the absorption of fluids by the resins and presence of biofilm. Thus, the roughness values are improved after polishing; there is no correlation between the values of roughness and porosity; and OCT is shown as a viable technique for viewing biofilm on both types of resin.

Key-words: Acrylic resin. Reline Resin. Optical Coherence Tomography. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Resina Lucitone 550	21
Figura 02 - Resina VipiCril Plus	21
Figura 03 - Resina Coe-Comfort	22
Figura 04 - Resina Soft-Comfort	22
Figura 05 - Constituição dos grupo experimentais	22
Figura 06 - Matriz metálica (64x10x2,5mm)	23
Figura 07 - Amostra de Resina (32x10x2,5mm)	23
Figura 08 - Prensagem de resina termopolimerizável em mufla metálica	24
Figura 09 - Amostra de Resina Coe-Comfort	26
Figura 10 - Amostra de Resina Soft-Comfort	26
Figura 11 - Preparo do Caldo	28
Figura 12 - Inóculo após 48 horas incubado em estufa microbiológica	28
Figura 13 - Amostra no interior do Tubo de Falcon	29
Figura 14 - Amostras e Inóculo padronizado na Estufa	29
Figura 15 - Rugosímetro (Mitutoyo – SJ 410)	31
Figura 16 - OCT (Callisto 930 nm– Thorlabs Inc).....	31
Figura 17 - Amostra (após inoculação) posicionada no OCT.....	33
Figura 18 - Vista da <i>Candida albicans</i> através do Microscópio	36
Figura 19 - Formação de colônias nas placas de Petri	37
Figura 20 - Alíquota de Caldo TSB esterilizado	37
Figura 21 - Alíquota de Caldo TSB contendo <i>Streptococcus Aureus</i>	37
Figura 22- Resina Soft-Comfort anterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	39

Figura 23 - Resina Soft-Confort posterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	39
Figura 24 - Resina Soft-Confort imersa em meio de cultura SD.....	39
Figura 25 - Resina Coe-Comfort anterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	40
Figura 26 - Resina Coe-Comfort posterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	40
Figura 27 - Resina VipiCril não-polida anterior à inoculação com <i>Streptococcus Aureus</i>	41
Figura 28 - Resina VipiCril não-polida anterior à inoculação com <i>Streptococcus Aureus</i>	41
Figura 29 - Resina VipiCril polida anterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	42
Figura 30 - Resina VipiCril polida posterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	42
Figura 31 - Resina Lucitone polida anterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i>	43
Figura 32 - Resina Lucitone polida posterior à inoculação com <i>Candida Albicans</i> ...	43
Figura 33 - Resina Lucitone não-polida anterior à inoculação com <i>Streptococcus Aureus</i>	44
Figura 34 - Resina Lucitone não polida posterior à inoculação com <i>Streptococcus Aureus</i>	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição das resinas selecionadas	21
Quadro 2 - Descrição dos ciclos de polimerização para as resinas acrílicas	25
Quadro 3 - Cepas de bactérias e leveduras	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas descritivas da rugosidade antes e após o polimento das resinas acrílicas	44
Tabela 2 - Medidas descritivas da rugosidade antes e após o polimento das resinas de reembasamento	45
Tabela 3 - Medidas descritivas da porosidade após o polimento entre os grupos	45
Tabela 4 - Correlação entre rugosidade e a porosidade em cada grupo	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÖES

PPF	Prótese Parcial Fixa
OCT	Optical Coherence Tomography
SLDs	Diodos Super Luminescentes
PMMA	Polimetacrilato de Metila
ISO	Internacional Organization for Standardization
EGDMA	Etilenoglicometacrilato
PEMA	Metacrilato de Polietileno
TSB	Triptona Soja
SD	Saboraud Dextrose
MO	Microorganismo

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	- Mais ou menos
\geq	- Maior ou igual
\leq	- Menor ou igual
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Celsius
μL	- Microlitro
g	- Grama
L	- Litro
μm	- Micrômetro
mm	- Milímetro
nm	- Nanômetro
EtOH	- Álcool Etílico
g/mol	- Massa Molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	TIPO DO ESTUDO.....	20
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	20
3.3	LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	20
3.4	SELEÇÃO DOS MATERIAIS.....	20
3.5	COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.6	PADRONIZAÇÃO DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE RESINA TERMOPOLIMERIZÁVEL.....	24
3.7	PADRONIZAÇÃO DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE RESINA DE REEMBASAMENTO.....	25
3.8	ACABAMENTO E POLIMENTO.....	26
3.9	EXPERIMENTO.....	27
3.9.1	Contaminação das Amostras	27
3.9.2	Preparo do Inóculo – <i>Streptococcus Aureus</i>	27
3.9.3	Preparo do Inóculo – <i>Candida Albicans</i>	28
3.9.4	Inoculação e Armazenamento das Amostras	29
3.10	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	30
3.10.1	Rugosimetria	30
3.10.2	Tomografia Por Coerência Óptica	31
3.11	OBTENÇÃO DAS IMAGENS.....	32
3.12	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS IMAGENS.....	33
3.13	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3.14	RISCOS E BENEFÍCIOS.....	34
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35

4	RESULTADOS	36
4.1	FORMAÇÃO DE BIOFILME	36
4.2	AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS IMAGENS.....	38
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	55

1 INTRODUÇÃO

O edentulismo é definido como a perda parcial ou total dos dentes naturais. Representa uma importante questão de saúde pública, tendo em vista sua alta prevalência no âmbito global, comprometendo diretamente as funções do sistema estomatognático, como mastigação, fala e deglutição. Impacta negativamente a nutrição e a aparência facial, e gera amplos efeitos sociais, como a dificuldade de socialização. ⁽¹⁾

Nas últimas décadas a taxa de perda dental diminuiu mas, apesar disso, o aumento na expectativa de vida da população tem contribuído para a manutenção de uma parcela significativa de indivíduos desdentados.⁽²⁾ A reabilitação oral de pacientes com perda total ou parcial de dentes pode ser realizada através de diferentes modalidades protéticas, fixa ou removível, ou, ainda, sobre dentes ou sobre implantes.⁽³⁾ Do ponto de vista funcional, não existem dúvidas que as próteses parciais fixas (PPF) ou implantesuportadas são as melhores opções de tratamento. Porém, o posicionamento dos dentes remanescentes no arco, a extensão do espaço protético, a perda do volume do rebordo, além dos fatores econômicos, culturais e sociais, são elementos que, por vezes, impossibilitam o planejamento protético de caráter fixo. ⁽⁴⁾

A maioria dos tratamentos reabilitadores ainda é realizada com próteses removíveis.⁽²⁾ Estas cumprem um papel relevante na reabilitação de desdentados totais ou parciais, sendo uma terapêutica satisfatória biologicamente e de custo acessível para uma grande parte da população.⁽⁵⁾ Para a confecção das próteses removíveis, o material de eleição há mais de 60 anos é a resina acrílica ativada termicamente, a qual sucedeu com amplas vantagens os materiais anteriormente empregados para tal finalidade.^(3,4,5) Isto porque a resina acrílica apresenta algumas vantagens, tais como: facilidade de processamento, características estéticas, estabilidade dimensional, boa tolerância pelos tecidos de suporte, ser não corrosiva, ter elevada resistência ao impacto e baixo custo.⁽⁶⁾

Ainda que possua, majoritariamente, propriedades físicas, mecânicas e biológicas favoráveis, a porosidade, a sorção de água e a rugosidade inerentes à resina acrílica favorecem sobremaneira a colonização superficial das próteses.⁽⁷⁾ A aderência de microrganismos é favorecida pela topografia áspera e irregular da

superfície da resina. Tais irregularidades fornecem um aumento na área de superfície e na expansão do número de nichos não limpos pela ação da língua ou musculatura orofacial ⁽⁸⁾, o que faz com que a prótese possa funcionar como um reservatório de microrganismos com potencial patogênico e contribua para o desenvolvimento ou manutenção de quadros infecciosos locais e sistêmicos. ⁽⁹⁾

A arquitetura do biofilme presente na superfície das próteses está associada às irregularidades e sulcos do aparelho. Isso se dá pelo fato de que os microrganismos que ali se aderem parecem estar protegidos das ações mecânicas de limpeza, não só da língua e musculatura orofacial, mas também da escovação, existindo assim uma forte associação entre a rugosidade de superfície e a formação de biofilme. ⁽¹⁰⁾

Outra desvantagem relacionada ao uso da resina acrílica como material para base protética é a pressão que esta pode exercer sobre os tecidos de suporte, de maneira que alguns usuários podem não tolerar a base rígida da prótese e necessitar de reembasadores orais de caráter resiliente para recobrir a base protética e promover conforto. ⁽¹¹⁾

Os reembasadores caracterizam-se por suas propriedades viscoelásticas que fazem com que o material absorva a energia de impacto das forças mastigatórias e a distribua uniformemente sobre os tecidos de suporte, promovendo conforto ao paciente. ⁽¹²⁾ As características mais favoráveis dos reembasadores são a resiliência a longo prazo e a boa adesão à base da prótese. Como desvantagem, a sorção de água também está presente neste tipo de material, assim como a possibilidade de deformação permanente, perda da maciez, deterioração da superfície, mudança de cor e probabilidade à adesão de microrganismos. ⁽¹³⁾

Nesse contexto, observa-se que a colonização de microrganismos acontece quase que na totalidade das próteses removíveis, isto porque, além das características desfavoráveis dos próprios materiais reabilitadores, a maioria da população usuária de próteses dentárias tem falhado na manutenção da limpeza destas. É importante conhecer não só as propriedades dos materiais odontológicos, mas também ter conhecimento dos produtos e métodos utilizados para a quantificação do biofilme formado nas próteses. ^(14,15) Para assim, testar a eficácia dos produtos de higiene e indicar ao profissional e ao paciente como e onde se deposita o biofilme sobre a prótese. ^(16,17)

Em algumas investigações, soluções evidenciadoras foram utilizadas para quantificar biofilme.^(17,18) Recentemente, a Tomografia de Coerência Óptica (TCO), cuja sigla em inglês é OCT (Optical Coherence Tomography), foi citada como um meio possível para visualizar e avaliar biofilme em discos de silicone elastoméricos e em resina acrílica, ambos contaminados com *Candida albicans*.^(19,20) Na Odontologia, pesquisadores já usaram o OCT para detectar e fornecer imagens de lesões cáries dentais, falhas de restaurações, diagnóstico de doenças periodontais e patologia oral em estudos in vitro e in vivo.^(21,22,23,24)

A técnica OCT pode ser utilizada para executar imagens estruturais de tecidos duros e moles do interior da cavidade bucal, tornando-se um valioso recurso de investigação de mudanças estruturais nos tecidos biológicos ou materiais odontológicos. Os resultados de vários estudos indicam que o OCT é capaz de produzir imagens de alta resolução em um número substancial de aplicações, demonstrando a viabilidade desta técnica como uma nova ferramenta de imagem para a comunidade odontológica.^(21,23,25)

Através do OCT é possível detectar a cárie em estágios iniciais, pois consegue-se acompanhar a desmineralização que ocorre no processo cariioso e altera as propriedades ópticas do esmalte e da dentina.^(24,26) Em outra situação, alterações em mucosa labial de pacientes com esclerose sistêmica também já foram identificadas por mudanças na espessura do epitélio, quando este é acometido pela doença.⁽²⁷⁾

Adicionalmente, o OCT tem se mostrado como uma opção para avaliação de biofilme, uma vez que oferece vantagens por não ser invasivo, poder ser realizado em tempo real, privilegiar as análises in-situ das camadas do biofilme e assim, manter a estrutura original deste sem a necessidade de um processo destrutivo da área de superfície.⁽¹⁹⁾

Dessa maneira, o presente trabalho avaliou, através do OCT a adesão de microrganismos em dois tipos de resina (acrílica e reembasadora), objetivando identificar se esta técnica realmente constitui-se como um meio viável para visualizar biofilme. Além disso, associando-se às imagens do OCT aos dados da rugosimetria por contato, também foram avaliadas e correlacionadas as medidas de rugosidade superficial e porosidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a adesão de microrganismos de colônia mista em resinas para base de próteses removíveis, rugosidade de superfície e porosidade, usando as técnicas de rugosimetria por contato e tomografia por coerência óptica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o padrão de rugosidade de superfície das resinas acrílicas e resinas reembasadoras, através das técnicas de rugosimetria e tomografia por coerência óptica;
- Verificar se há associação entre a rugosidade de superfície e porosidade em quatro resinas diferentes;
- Verificar se a Tomografia de Coerência Óptica é um meio viável para avaliar microrganismos de colônia mista (*Candida albicans* e *Streptococcus aureus*).

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo experimental laboratorial.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa foi realizada em laboratório, in vitro, não incluindo técnicas observacionais ou experimentais em seres vivos que exigissem a aprovação do Comitê de Ética ou consentimento de participante voluntário da pesquisa.

Os dados foram coletados e analisados para os objetivos propostos pela pesquisa e ficaram sob a guarda do pesquisador.

3.3 LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fotônica e Biofotônica (Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco), onde foi estabelecida a metodologia do trabalho e realizada a execução do projeto piloto, além de parte das imagens com OCT; Laboratório de Prótese Dentária (Faculdade de Odontologia de Pernambuco), onde foram confeccionadas as amostras de resina; e Laboratório de Biofotônica e Materiais Aplicados em Odontologia da Faculdade ASCES (Associação Caruaruense de Ensino Superior), onde foi realizado o preparo dos microrganismos e inoculação das amostras, além da obtenção de imagens com OCT usando o mesmo equipamento que foi utilizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.4 SELEÇÃO DOS MATERIAIS

Foram selecionadas as resinas mais usualmente utilizadas para a confecção de próteses removíveis. Para as resinas termopolimerizáveis optou-se pelo processamento da maneira convencional, por meio de energia térmica, a fim de

reproduzir, o máximo possível, as condições reais de uma prótese na boca quando da formação do biofilme.

Foram utilizados quatro tipos de resina para base de prótese, duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (Figs. 01 e 02) e duas acrílicas reembasadoras (Figs 03 e 04), descritas no quadro 1.

Quadro 1. Descrição das resinas selecionadas.

Material	Marca Comercial	Fabricante	Polimerização	Cor
Resina Acrílica	Lucitone 550 (n=10)	Dentsply	Termopolimerizável	Rosa Claro
Resina Acrílica	VipiCril Plus (n=10)	VIPI	Termopolimerizável	Rosa Médio
Reembasador	Coe-Comfort (n=10)	GC America	Autopolimerizável	Incolor
Reembasador	Soft-Confort (n=10)	Dencril	Autopolimerizável	Rosa



Fig. 01. Resina Lucitone 550



Fig. 02. VipiCril Plus



Fig. 03. Resina Coe-Comfort



Fig 04. Resina Soft-Comfort

3.5 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este estudo foi composto por quatro grupos e o número de amostras foi determinado por uma amostra de conveniência. Para cada grupo foram confeccionadas 10 amostras (n=10), a partir das resinas já descritas nesta metodologia. As resinas foram processadas e polidas de acordo com as orientações de cada fabricante. Entretanto, nas resinas acrílicas, o polimento só foi realizado em uma das faces da amostra, simulando, a superfície externa da prótese. A face que simula a superfície interna da prótese não foi polida, assim como acontece com as próteses que são instaladas na cavidade bucal.

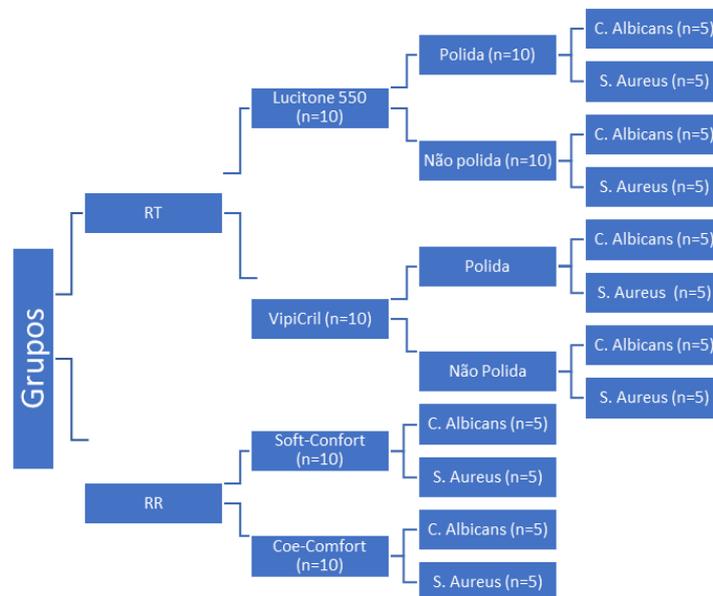


Figura 5. Constituição dos grupo experimentais.

Para padronização das amostras, foram utilizadas matrizes metálicas seguindo as dimensões de altura preconizadas pela American Dental Association (ADA) ⁽²⁸⁾. Ao final do processamento, as amostras apresentavam formato retangular e dimensões de 32x10x2,5mm (Fig. 07). Em seguida, as amostras foram acabadas, polidas e armazenadas em água destilada por 48 horas, para eliminação de monômeros residuais. Essa prática do armazenamento em água é recomendada para diminuir a possibilidade de irritação ou processos alérgicos na mucosa oral em decorrência da presença exagerada de monômeros na resina ⁽²⁹⁾. Apesar do estudo ser do tipo laboratorial, optou-se por manter o armazenamento em água para simular as condições reais do material quando exposto aos microrganismos da cavidade oral.

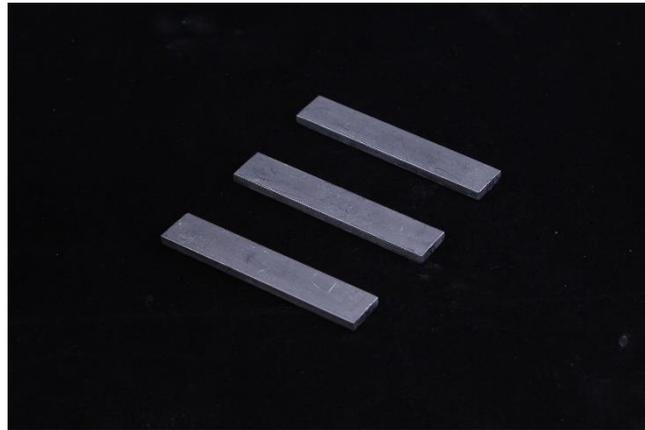


Fig. 06. Matriz metálica (64x10x2,5mm)



Fig. 07. Amostra de Resina (32x10x2,5mm)

3.6 PADRONIZAÇÃO DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE RESINA TERMOPOLIMERIZÁVEL

Para confecção das amostras, foram utilizadas matrizes metálicas com as dimensões de 64x10x2,5mm que foram incluídas em muflas metálicas. Inicialmente, foi dispensado 100g de gesso tipo III (Herodent, Vigodent/Coltene, Rio de Janeiro, Brasil) na mufla metálica (LFS, São Paulo, Brasil). Após a reação de presa, uma muralha foi confeccionada com silicone de condensação de alta viscosidade (Zetalabor, Zhermack, Rovigo, Itália). O silicone foi então manipulado de acordo com as orientações do fabricante, acomodado dentro da mufla e as matrizes metálicas foram inseridas no silicone. Após sua polimerização, o conjunto (muralha e matrizes) foi isolado com vaselina sólida (Quimidrol, Curitiba, Brasil), assim como a contra-mufla, e então dispensou-se mais uma porção de gesso e procedeu-se o fechamento da mufla metálica com parafusos próprios. Com a cristalização do gesso, as muflas foram abertas e pode-se visualizar os orifícios deixados pelas matrizes metálicas. O gesso recebeu isolante para resina (Cel-Lac, SSWhite, Rio de Janeiro, Brasil) e em seguida, as resinas selecionadas (Lucitone 550, Dentsply, Tulsa, EUA e VipiCril Plus, VIPI, São Paulo, Brasil) foram manipuladas seguindo o protocolo do fabricante. Quando atingiram a fase plástica, as resinas foram incluídas nos orifícios deixados no gesso e prensadas (1000 kgf) em prensa hidráulica (Fig. 08). A polimerização procedeu-se de maneira convencional (em banho de água) de acordo com as orientações do fabricante, descritas no quadro 2.



Fig. 08. Prensagem de resina termopolimerizável em mufla metálica

Quadro 2. Descrição dos ciclos de polimerização para as resinas acrílicas

Polimerização	
Lucitone 550	Vipicril Plus – Ciclo Australiano Adaptado
<ul style="list-style-type: none"> - Mergulhar o conjunto, mufla e prensa, devidamente travados em água quente da seguinte maneira: - À temperatura de aproximadamente 73°C ± 1°C durante 1 ½ hora. Seguido por ½ hora em água fervendo. - Foram realizadas checagens periódicas com auxílio de um termômetro. - Desligar e deixar esfriar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colocar a Mufla em água fria e proceder da seguinte maneira: 30 minutos para o aquecimento até 65°C; - Manter a Mufla em 65°C por 1 hora; Deixar mais 30 minutos, para elevar a temperatura de 65°C para 100°C; - Permanecer com a Mufla à 100°C durante mais 1 hora; - Desligar e deixar esfriar.

Fonte: <http://www.vipi.com.br/portal>; <https://www.dentsplysirona.com>.

3.7 PADRONIZAÇÃO DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE RESINA DE REEMBASAMENTO

As amostras das resinas reembasadoras foram confeccionadas com as mesmas dimensões das amostras das resinas termopolimerizáveis, a partir das mesmas matrizes metálicas. Entretanto, como as resinas de reembasamento oferecem uma cobertura às bases das próteses removíveis, as amostras deste tipo de resina foram confeccionadas sobre uma base de resina acrílica, o que modificou a técnica descrita nesta metodologia. Após dispensar o gesso, e inserir o silicone e as matrizes na mufla, foi adicionada uma lâmina de cera n.07 sobre as matrizes metálicas com as mesmas dimensões destas (Newwax, Technew, Rio de Janeiro, Brasil) para que posteriormente, ao abrir a mufla, houvesse espaço para a inserção de ambas as resinas, acrílica e reembasadora. Procedeu-se com o isolamento do conjunto (silicone e matrizes) e da contra-mufla, e colocação do gesso. Após a presa do gesso, a mufla

foi aberta, a resina acrílica (na fase plástica) foi inserida nas cavidades deixadas no gesso e sobre ela foi colocada a resina de reembasamento. Em seguida, foi realizada a prensagem (1000kgf) em prensa hidráulica e a pela polimerização, pelo mesmo método descrito no item anterior. Dessa maneira, foi simulado um reembasamento indireto. Esta modificação na técnica foi idealizada pelo pesquisador.

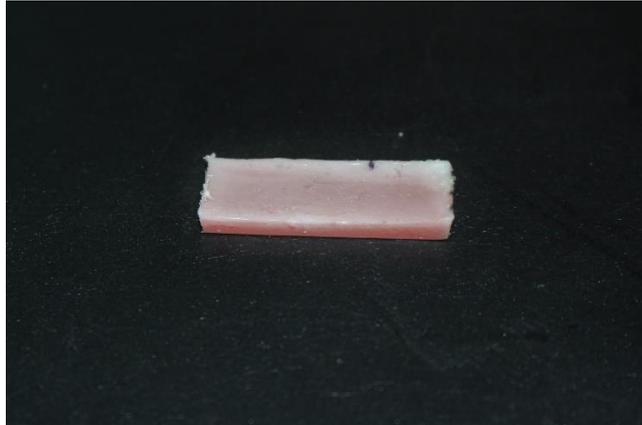


Fig.09 Amostra de Resina Coe-Comfort (32x10x2,5mm)



Fig. 10 Amostra de Resina Soft-Comfort (32x10x2,5mm)

3.8 ACABAMENTO E POLIMENTO

O acabamento foi realizado com fresas de tungstênio (Maxicut) e lixas d'água com granulação de 800, 600 e 300, ambos acoplados a turbina de baixa rotação. Para as amostras de resina acrílica foi empregada a sequência de polimento mecânico, sendo realizado em torno mecânico, utilizando pedra-pomes (SSWhite, Rio de Janeiro, Brasil) e água com escovas de pelo, seguido por pasta branco de Espanha (Lysanda, São Paulo, Brasil) e água em roda de pano.

3.9 EXPERIMENTO

3.9.1 Contaminação das Amostras

Para a contaminação das amostras foi utilizada uma bactéria e uma levedura, ambas cedidas pelo Laboratório de Biofotônica e Materiais Aplicados em Odontologia da Faculdade ASCES (Quadro 3). Nesta etapa, as amostras foram subdivididas dentro de cada grupo (n=5), assim as amostras numeradas de 1 a 5 foram inoculadas com *Candida albicans* e, as amostras de 6 a 10, com *Streptococcus aureus*.

Quadro 3. Cepas de bactérias e leveduras

Microrganismos	Identificação	Características Morfológicas
<i>Streptococcus aureus</i>	UFPEDA 02	Cocos Gram-positivos
<i>Candida albicans</i>	URM 6547	Leveduras

3.9.2 Preparo do Inóculo – *Streptococcus aureus*

No dia anterior ao experimento, foi preparado o caldo Triptona Soja (TSB) para as bactérias, na proporção de 30 gramas (g) de pó para 1 litro (L) de água destilada (30g/L). Em um tubo de ensaio de vidro, foi dispensado 20ml do caldo TSB e, então, vertido o inóculo (*Streptococcus aureus*) no interior do tubo. O inóculo estava conservado por meio de congelamento, e só foi vertido após descongelar em temperatura ambiente. O tubo de ensaio contendo a bactéria foi armazenado em estufa microbiológica a 37°C durante 24 horas. Passado o tempo de crescimento do inóculo, foi realizada a padronização do mesmo. A padronização tem como objetivo ajustar a concentração do inóculo no momento do experimento, fazendo com que esta

fique entre 0,08 e 0,1, o que equivale a 1 a 2×10^8 UFC/ml e é corresponde ao valor 0,5 da Escala de Mac Farland. A escala de Mc Farland é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por um aumento das partículas (microrganismos) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura.

Para a padronização, colocou-se 1,5ml de caldo TSB esterilizado e 1,5ml do caldo contendo o inóculo crescido em um novo tubo de ensaio, e observou-se o padrão de turbidez da solução por meio da comparação, a olho nu, com o tubo 0,5 da Escala de MacFarland. Até que a turbidez do novo tubo estivesse semelhante ao da Escala, continuou-se o procedimento de padronização, retirando volume do tubo que estava sendo padronizado e acrescentando a mesma proporção de caldo TSB esterilizado.⁽³⁰⁾

3.9.3 Preparo do Inóculo – *Candida albicans*

A inoculação com Levedura (*Candida albicans*) seguiu o protocolo já descrito para as bactérias. Diferindo apenas o meio de cultura dos tubos de ensaio, sendo utilizado para estes o caldo Saboraud-Dextrose (SD – Fig. 11); e o tempo de espera de crescimento da levedura que foi de 48 horas (Fig. 12).

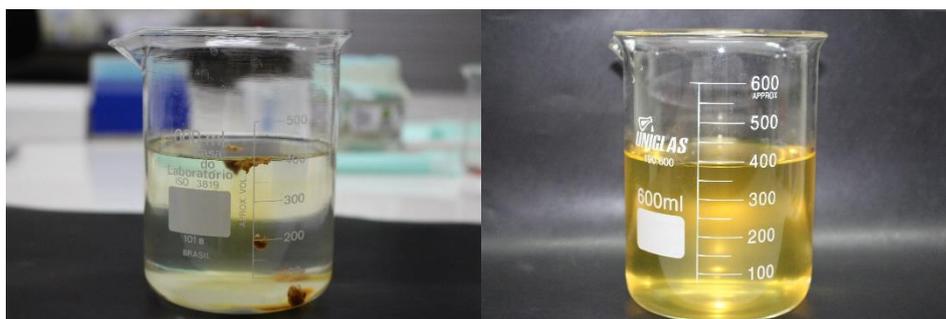


Fig.11. Preparo do Caldo

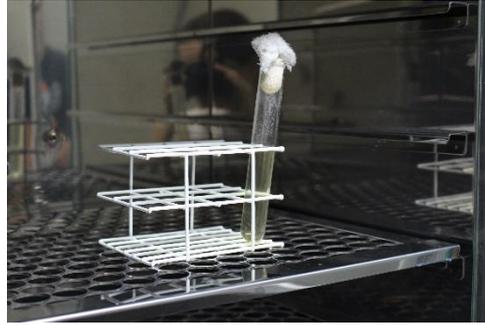


Fig.12. Inóculo após 48 horas incubado em estufa microbiológica

3.9.4 Inoculação e Armazenamento das Amostras

Com o inóculo padronizado, procedeu-se a contaminação das amostras. Foi dispensado em tubos de Falcon 4ml do caldo TSB esterilizado e 1ml do inóculo. Em seguida, as amostras (previamente esterilizadas) foram colocadas no interior destes tubos com a ajuda de uma pinça clínica estéril. Os tubos de Falcon (Fig. 13) foram então numerados e armazenados em estufa microbiológica (Fig. 14) a 37°C durante 96 horas. No decorrer desse período, foi realizada uma troca de meio de cultura, após 48 horas, para manter os nutrientes do caldo viáveis para as leveduras; e duas trocas de meio de cultura, após 32 horas, para as bactérias.



Fig. 13. Amostra no interior do Tubo de Falcon



Fig. 14. Amostras e Inóculo padronizado na Estufa

Após a inoculação, alíquotas do caldo foram removidas, submetidas à diluição seriada em água destilada (10mm) e semeadas em meio de cultura sólido Agar

Mueller-Hinton ou Agar Sabouraud nas placas de Petri. Estas últimas ficaram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas (para bactérias) e 48 horas (para leveduras). Depois desse período, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

Foram realizados três ciclos de inoculação das amostras, tanto para a bactéria quanto para a levedura. Após cada inoculação, as amostras de resina eram esterilizadas e novamente inoculadas com um novo microrganismo da cepa já descrita. No terceiro ciclo, metade das amostras foi imersa somente em meio de cultura (TSB e SD) e água para obter-se um padrão de comparação com as amostras já inoculadas. Em cada grupo de resina, duas amostras ficaram em TSB, duas em SD e uma em água.

3.10 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram submetidas à análise através da rugosimetria de superfície e da tomografia por coerência óptica. Ambas foram realizadas em 2 momentos, a rugosimetria obteve os valores de rugosidade antes e depois do polimento, e a tomografia por coerência óptica, antes e depois do período de cultura de microrganismos. Para a cultura de microrganismos, as amostras foram subdivididas dentro de cada grupo, assim as amostras numeradas de 1 a 5 foram inoculadas com *Candida albicans* e, as amostras de 6 a 10 com *Streptococcus aureus*.

3.10.1 Rugosimetria

A rugosidade é definida como o conjunto de desvios microgeométricos, caracterizado pelas pequenas saliências e reentrâncias presentes em uma superfície. ⁽³¹⁾ Esta pode ser medida através do rugosímetro (Mitutoyo – SJ410, Fig. 15), aparelho eletrônico destinado à avaliação de rugosidades e de ondulações de superfícies, sendo composto por uma ponta apalpadora, unidade de acionamento, amplificador e registrador. A rugosidade superficial pode ser determinada através de dados fornecidos pelo apalpador que percorre uma superfície definindo picos e vales. Assim, dividindo-se, de acordo com a fórmula matemática, a área de picos e vales pela

distância percorrida pelo apalpador em linha reta, obtém-se o parâmetro de rugosidade média denominado de Ra. ⁽³²⁾



Fig. 15. Rugosímetro (Mitutoyo – SJ 410)

Em cada amostra foram realizadas três leituras em diferentes áreas, sempre no sentido horizontal, contemplando 10 milímetros (mm) da amostra. As leituras foram feitas com a ponta apalpadora do Rugosímetro, a qual está conectada a um visor de cristal líquido e registra digitalmente a leitura de superfície. Como a rugosidade é medida por meio desta ponta apalpadora, que toca a superfície da resina, arranhões poderiam ser gerados nas amostras no momento da leitura, assim, a área submetida ao rugosímetro foi isolada, por meio de uma marcação, e excluída da tomada de imagens no OCT. Os valores de rugosidade foram medidos para todas as faces da amostra antes do polimento. Após o polimento, só a face polida voltou ao rugosímetro.

3.10.2 Tomografia por Coerência Óptica

Nesta pesquisa, o OCT (Callisto 930 nm– Thorlabs Inc) foi utilizado para avaliar a estrutura das resinas acrílicas e reembasadoras, antes e depois da inoculação com microrganismos, buscando-se observar se havia alterações estruturais na superfície e no interior das amostras. A técnica OCT baseia-se na avaliação da luz retroespalhada pelo objeto e fornece informações detalhadas das estruturas analisadas. No presente estudo, uma imagem 2D foi obtida pela combinação de

resolução de profundidade e perfis de intensidade do espalhamento de luz ao longo da seção de interesse na amostra.⁽²⁰⁾ O sistema de imagem utilizado explora um diodo super luminescente como fonte de luz, emissor de luz infravermelha, com comprimento de onda centrado em 930 nm, largura espectral de 100 nm, resolução axial no ar de 7 μm e gera imagens compostas por 2000 colunas e 512 linhas.



Fig. 16. OCT (Callisto 930 nm– Thorlabs Inc)

3.11 OBTENÇÃO DAS IMAGENS

Para a realização das imagens no OCT, antes da inoculação, as amostras de resina acrílica foram esterilizadas em autoclave; e as amostras de resina reembasadora foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2%, por no mínimo 24 horas. Foram realizadas 10 imagens para cada região avaliada nas amostras limpas. No grupo das resinas acrílicas, foram avaliadas as superfícies polidas e não-polidas; no grupo dos reembasadores, só foi avaliada a superfície preenchida pela resina de interesse. Após a inoculação das amostras, no momento da confecção das imagens, o OCT foi protegido por papel-filme para evitar contaminação. As amostras foram retiradas da estufa microbiológica e com a ajuda de uma pinça esterilizada, foram transferidas do tubo de ensaio, no qual estavam inseridas, para uma placa de Petri esterilizada a fim de aguardar a secagem, já que estavam imersas em meio de cultura. Após secagem, foram feitas as imagens das mesmas superfícies contempladas na fase anterior à inoculação. As imagens correspondentes às amostras dos quatro

grupos foram avaliadas e comparadas entre si quanto aos seus aspectos quantitativos e qualitativos.

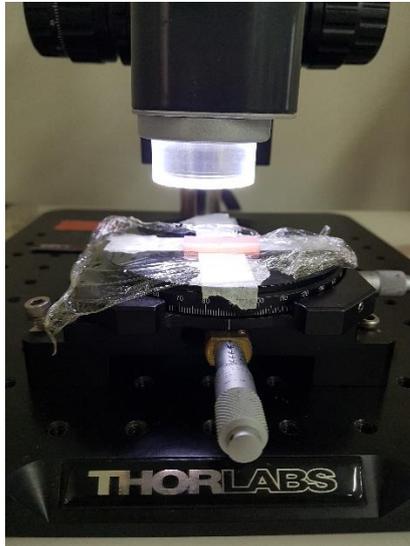


Fig. 17. Amostra (após inoculação) posicionada no OCT

3.12 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS IMAGENS

Foram avaliados quatro tipos de resina, entretanto as resinas acrílicas apresentavam uma face polida e uma não-polida, fazendo com que nestes grupos, fossem realizadas duas avaliações em uma única amostra. Assim, foram obtidas, no mínimo, 60 imagens para cada fase do ciclo (antes e depois da inoculação), resultando em 120 imagens de 40 amostras. Para a avaliação qualitativa, após a aquisição das imagens, cento e dezesseis (116) delas foram selecionadas e agrupadas em duplas (58). Duas amostras foram eliminadas da avaliação porque as imagens obtidas não foram consideradas adequadas. Em seguida, as imagens selecionadas foram submetidas a uma avaliação cega por dois avaliadores previamente calibrados. Estas imagens foram extraídas dos diferentes ciclos realizados, e para cada amostra foram colocadas duas imagens lado a lado (antes e depois da inoculação) sem identificar o tipo de resina, o tipo de microrganismo e a ordem em que apareciam na avaliação. Cada dupla de imagens pertencia a mesma amostra e ao mesmo ciclo de inoculação; e a sua distribuição na avaliação foi aleatória. Foi obtido o valor de concordância inter-examinador (valor de Kappa) e observado se as alterações descritas por esses eram semelhantes.

3.13 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação quantitativa, foi avaliado o padrão de porosidade através do processamento das imagens por um programa específico (MatLab). Porosidade é uma grandeza física dada pelo volume do espaço poroso. ⁽³³⁾ Assim, cálculo da porosidade e do diâmetro dos poros foi baseado em imagens bidimensionais extraídas de um plano das amostras. O objetivo do processamento é obter uma imagem binária, que contém informações estruturais sobre porosidade e distribuição do tamanho de poros. e pode ser definida como a relação $U = V_P / V$, onde V_P e V são o volume poroso e volume total da amostra, respectivamente. Áreas vazias nas imagens do OCT são consideradas espaço poroso. Para a versão bidimensional pode-se escrever porosidade como:

$$\emptyset = A_v / A$$

onde A_v e A são a área vazia e total da imagem, respectivamente. Neste caso, a área é medida em número de pixels da imagem do OCT (em duas dimensões). O processamento da imagem é dividido em duas partes. Inicialmente, o primeiro algoritmo determina o valor de limiar otimizado para a porosidade. Então, todas as imagens são binarizadas. O valor e a distribuição do tamanho dos poros são obtidos no segundo algoritmo ⁽³⁴⁾. Neste estudo, foram processadas 5 imagens de cada amostra e obtido o valor médio da porosidade por imagem, por amostra e por grupo de resina.

3.14 RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos estavam associados ao operador durante os procedimentos de manipulação da resina acrílica e contaminação dos corpos-de-prova. A manipulação da resina exigiu cuidados como o uso de luvas e óculos de proteção, para evitar irritações na pele ou nos olhos. O procedimento de contaminação dos corpos-de-prova também exige o uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI), como luvas, máscaras e jalecos, para evitar a inoculação do próprio operador.

Os benefícios estão relacionados à possibilidade de conhecer as características estruturais dos materiais que compõem as bases protéticas, como a rugosidade e a porosidade, grandezas que estão diretamente relacionadas à resistência e a manutenção da limpeza das próteses.

Outro benefício é a possibilidade de usar o OCT para visualizar biofilme, preservando a estrutura deste último sem a necessidade de processamentos ou procedimentos adicionais. Assim, torna-se mais fácil identificar a maneira como o biofilme se deposita nas resinas e buscar melhorar o padrão de higienização dos pacientes usuários de próteses, diminuindo a possibilidade destas funcionarem como agentes causadores de doenças.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Foram calculadas a média e o desvio-padrão de cada grupo. A distribuição normal foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se há diferença entre os grupos, foi usado o teste de Kruskal Wallis (para os quatro grupos) e Mann-Whitney (quando tinham apenas dois grupos). O teste não paramétrico de Wilcoxon foi usado para as análises finais entre os tempos de cada grupo. A análise de correlação de Pearson também foi realizada. A significância estatística de todos os testes foi considerada como $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A confirmação da presença de microrganismos viáveis nas amostras submetidas à inoculação foi possível pela análise de alíquotas do caldo SD, removidos de amostras Lucitone contaminadas com *Candida albicans*, através de microscopia óptica. Um lâmina de vidro foi processada, corada com fucsina e levada ao microscópio (Nikon E100). Observou-se a estrutura da *Candida* (Fig. 18) pela presença das hifas e suas ramificações com a lente de aumento 100x. Foi necessário realizar a confecção da lâmina de microscópio para a *Candida albicans*, porque o padrão de turvação era pequeno, sendo necessário confirmar a viabilidade da cepa utilizada.

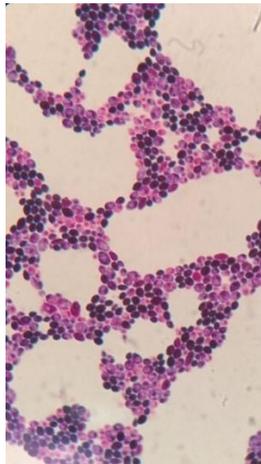


Fig. 18. Vista da *Candida albicans* através do Microscópio

Ainda foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) em todos os ciclos de inoculação, escolhendo-se uma das amostras de cada grupo de resina aleatoriamente. Na figura 19, a contagem de UFC/ml pertence ao terceiro ciclo de inoculação, onde foi escolhida a primeira amostra de cada grupo, todas inoculadas com *Candida albicans* e as setas laranjas indicam as colônias formadas.

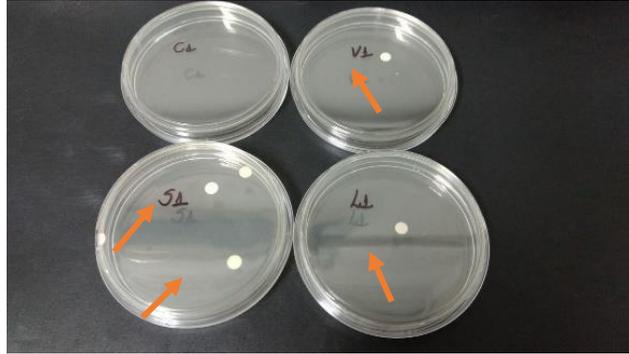


Fig. 19. Formação de colônias nas Placas de Petri

Também foram levadas ao OCT alíquotas do meio de cultura esterilizado e alíquotas do caldo contaminado. Na figura 20, pode ser visualizada um gota do caldo esterilizado e na figura 21, uma gota do caldo contaminado com *Streptococcus aureus*. Diferenças entre as duas imagens abaixo são observadas quanto ao aumento do espalhamento da luz incidente e penetração de luz na região abaixo da superfície do caldo contendo a bactéria, o que se repete nas imagens das amostras de resina inoculadas.

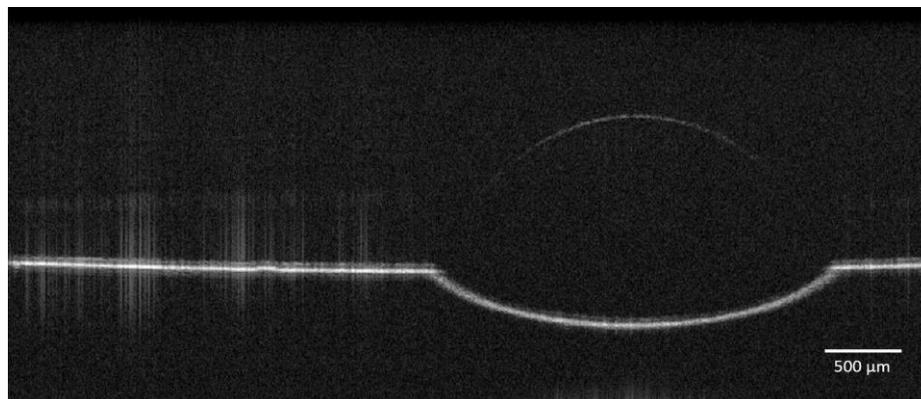


Fig. 20. Alíquota de Meio de Cultura TSB esterilizado.

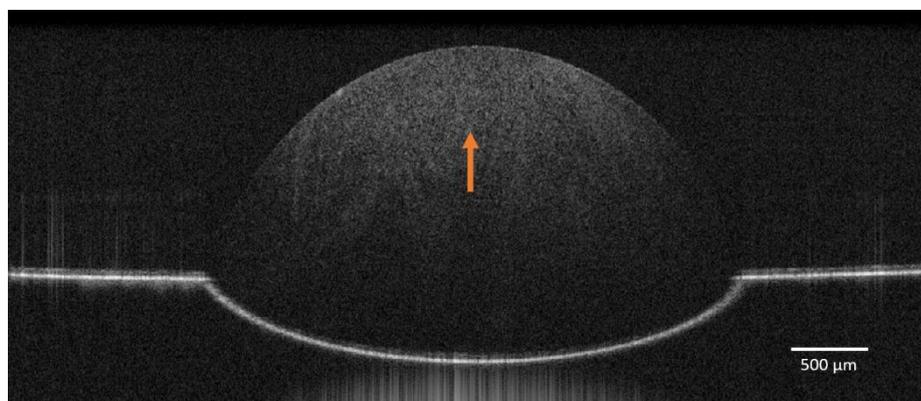


Fig.21. Alíquota de Caldo TSB contendo *Streptococcus aureus*.

4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS IMAGENS

Foi realizada uma avaliação das imagens, obtidas por meio do OCT, através de um estudo cego. A avaliação consistiu na observação de diferenças entre as imagens iniciais (limpas) e as finais (inoculadas) no que diz respeito ao tamanho dos poros, retroespalhamento e profundidade de penetração de luz. O índice de Kappa, que consiste em uma medida de concordância inter-examinador, foi estabelecido para medir o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. O valor encontrado foi 0,655, o que pode ser considerado um nível de concordância aceitável. Na maioria das análises, houve concordância entre os avaliadores quanto a presença ou ausência de diferença entre as imagens. Das 58 duplas de imagens analisadas, só houve discordância em 8 casos. Foi relatado ainda um aumento da penetração, espalhamento de luz e diminuição dos poros nas imagens de resinas inoculadas com microrganismos.

As figuras 22, 23 e 24 são imagens da resina Soft-Confort. A primeira (fig. 22) foi realizada antes da inoculação com *Candida albicans*, onde observa-se a superfície da resina e sua estrutura interna. Na figura 23, a amostra de resina Soft foi imersa em meio de cultura sem microrganismo, resultando na formação de uma área bem delimitada nas primeiras camadas da superfície da amostra, onde observa-se maior intensidade de espalhamento de luz. Já na figura 24, a imagem foi obtida após a inoculação com *Candida albicans*. Observa-se que as primeiras camadas de resina foram impregnadas por meio de cultura e coleção fúngica, todavia os poros da resina apresentam-se mais livres de material, se comparado à fig. anterior (24), na qual há apenas meio de cultura. Observa-se ainda uma linha branca bem definida, possivelmente resultante da deposição de *Candida* e meio de cultura nos poros de subsuperfície do corpo de prova.

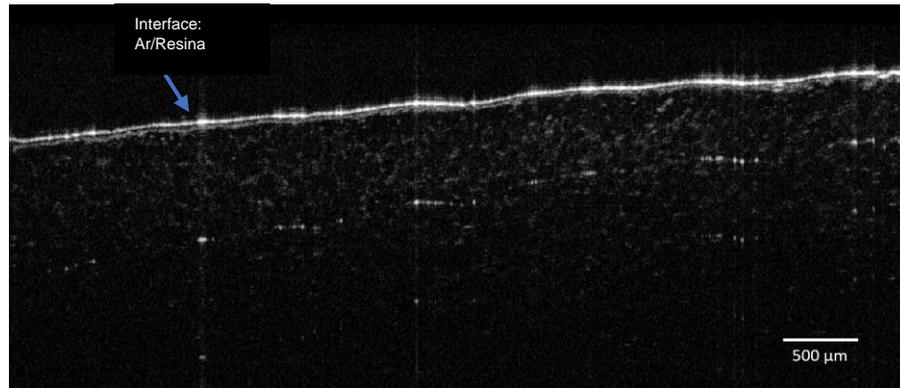


Fig. 22. Resina Soft-Comfort anterior à inoculação com *Candida albicans*. Barra de Escala representa 500μm.

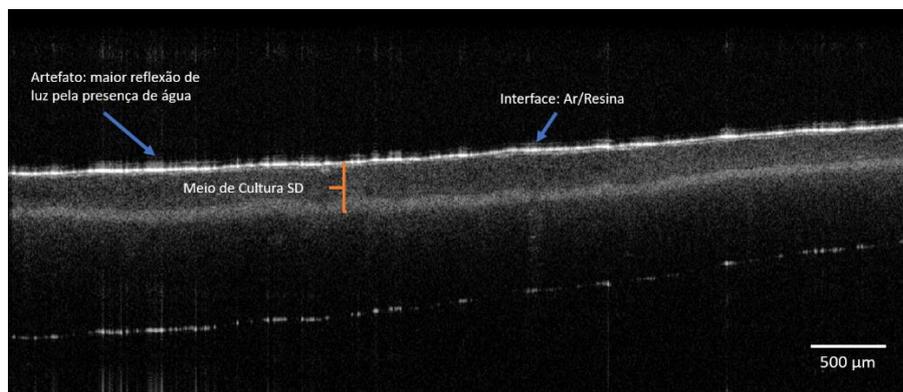


Fig. 23. Resina Soft-Comfort imersa em meio de cultura SD. Formação de área bem delimitada com maior intensidade de espalhamento de luz.

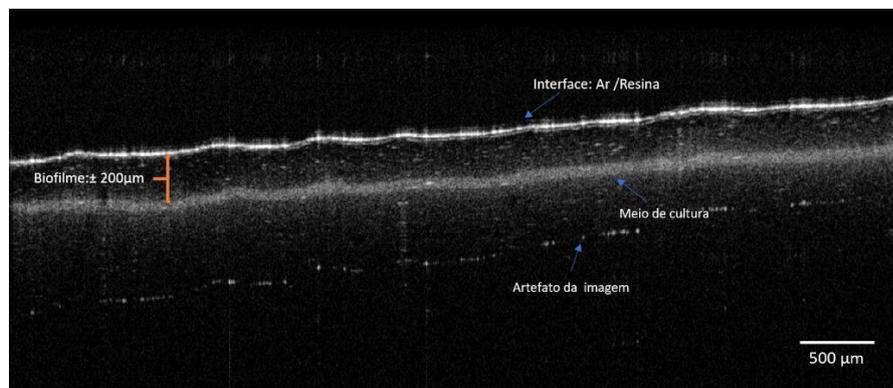


Fig. 24. Resina Soft-Comfort posterior à inoculação com *Candida albicans*. Observa-se a presença do biofilme e do meio de cultura.

Nas figuras 25 e 26 podem ser visualizadas as imagens da resina Coe-Comfort, antes e depois da inoculação com *Candida albicans*, respectivamente. Apesar das resinas Soft-Comfort e Coe-Comfort serem classificadas como materiais reembasadores, autopolimerizáveis à base de resina acrílica, observa-se que a estrutura interna delas varia de maneira significativa, em virtude das diferenças em

suas composições. Por exemplo, a resina Coe-Comfort difere da Soft-Comfort por apresentar um antifúngico em sua formulação. Assim, além de ser estruturalmente diferente, a presença do antifúngico impede o crescimento da *Candida albicans*, fazendo com que não exista diferença quando comparamos as imagens da Coe-Comfort, antes e depois da inoculação.

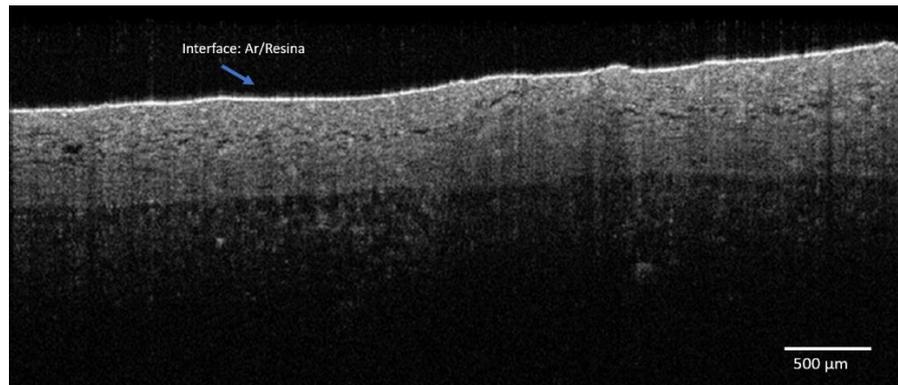


Fig. 25. Resina Coe-Comfort anterior à inoculação com *Candida albicans*.

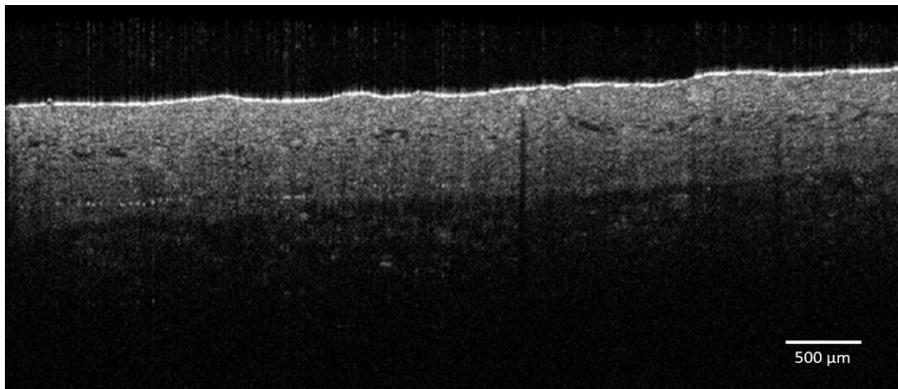


Fig. 26. Resina Coe-Comfort posterior à inoculação com *Candida albicans*.

As amostras de resina acrílica termopolimerizáveis apresentam, internamente, uma estrutura com poros mais visíveis (figs. 27 a 34) que as resinas de reembasamento, tais porosidades são inerentes à técnica utilizada para confecção das amostras (mesma técnica utilizada para a confecção das próteses totais) Estas porosidades, superficiais e internas, podem abrigar colônias de microrganismos⁽¹³⁾. Quando inoculadas com microrganismos, seja *Streptococcus aureus* ou *Candida albicans* é possível visualizar nas amostras de resina acrílica alterações nas imagens relacionadas com o aumento do espalhamento de luz na região abaixo da superfície

da resina e o preenchimento dos poros, que sugere a deposição de biofilme nas primeiras camadas da amostra.

Na figura 27, observa-se a imagem da face não-polida da resina acrílica VipiCril Plus anterior à inoculação, onde pode ser identificada a superfície da resina e a presença de porosidades no interior da amostra. Na figura 28, observa-se a imagem da mesma face na mesma amostra, porém, após inoculação com *Streptococcus aureus*, onde pode ser visualizada uma maior intensidade de reflexão de luz, abaixo da superfície da resina, sugerindo a presença de deposição de biofilme nessa região.

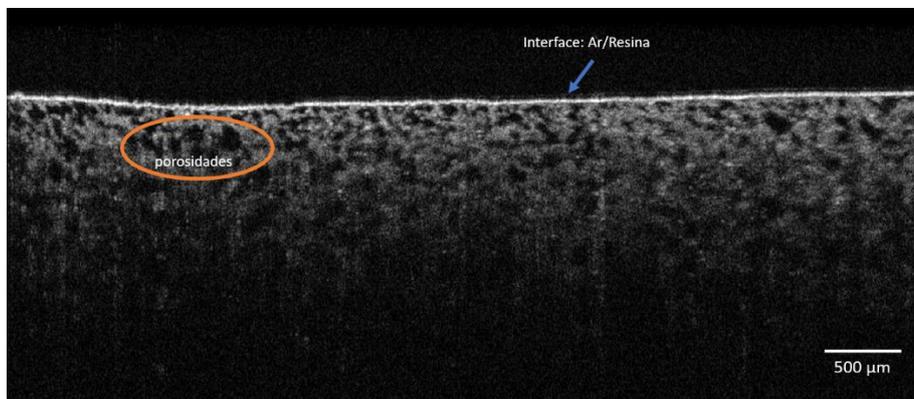


Fig. 27. Resina VipiCril não-polida anterior à inoculação com *Streptococcus aureus*.

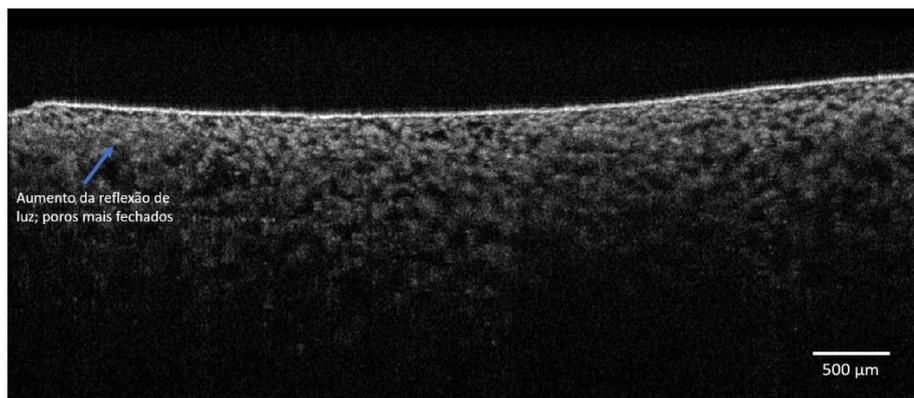


Fig. 28. Resina VipiCril não-polida posterior à inoculação com *Streptococcus aureus*.

Nas figuras 29 e 30, observa-se a face polida da resina VipiCril Plus anterior e posterior à inoculação, respectivamente. As imagens diferem entre si, pelo fato da imagem posterior à inoculação apresentar maior profundidade de penetração de luz.

Isto pode ser explicado pela presença de meio de cultura, já que na presença de água há um aumento do espalhamento de luz. Observa-se ainda um aumento na intensidade de reflexão de luz abaixo da superfície, sugerindo a presença do biofilme.

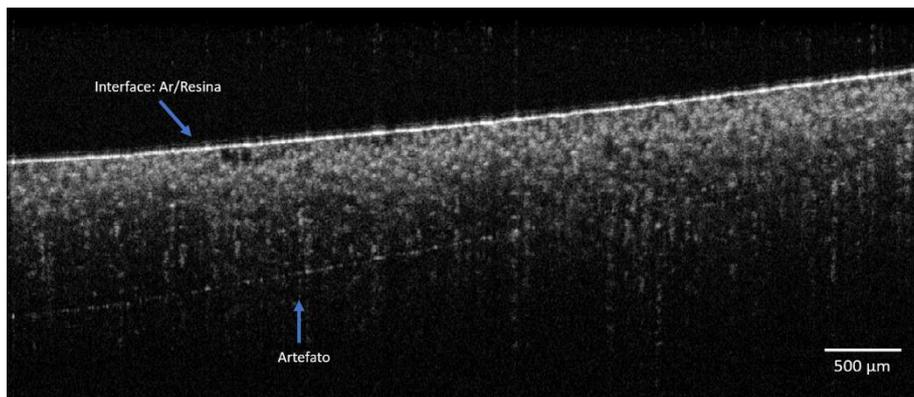


Fig. 29. Resina VipiCril polida anterior à inoculação com *Candida albicans*.

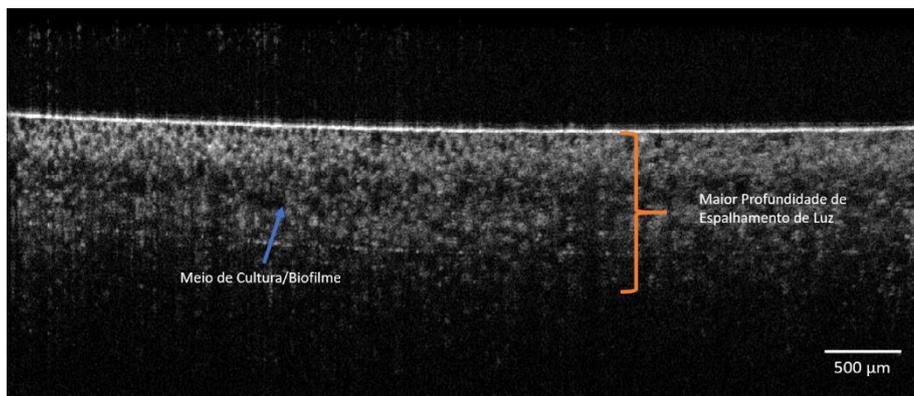


Fig. 30. Resina VipiCril polida posterior à inoculação com *Candida albicans*.

Nas figuras 31 e 32, observa-se a face polida da resina acrílica Lucitone 550, anterior e posterior à inoculação com *Candida albicans*, respectivamente. Na figura 31, é possível visualizar as porosidades da resina. Na figura 32, além das porosidades, há um aumento do espalhamento de luz nas primeiras camadas da resina (área delimitada por linha laranja), preenchendo, aparentemente, o interior dos poros.

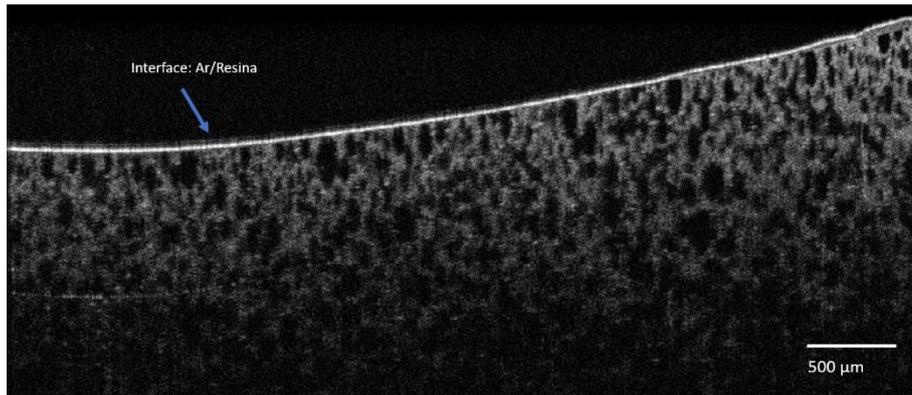


Fig. 31. Resina Lucitone polida anterior à inoculação com *Candida albicans*.

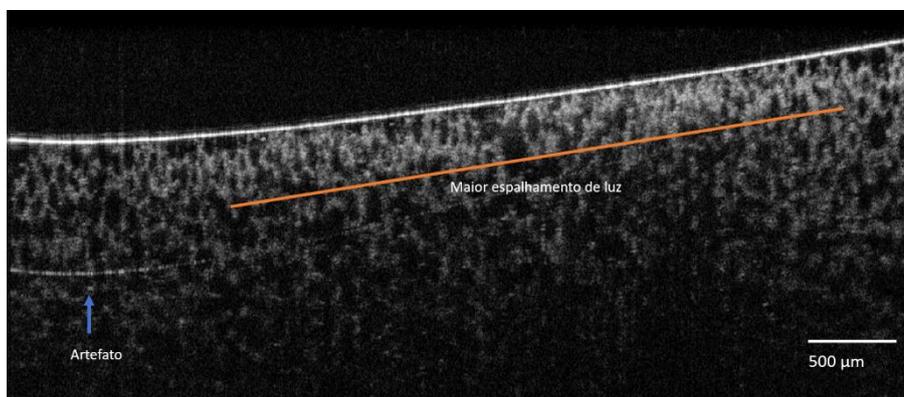


Fig. 32. Resina Lucitone polida posterior à inoculação com *Candida albicans*.

Nas figuras 33 e 34, é vista a face não-polida da resina acrílica Lucitone 550. A figura 33 corresponde a imagem realizada anterior à inoculação com *Streptococcus aureus*. Já a figura 34 corresponde a imagem realizada posterior à inoculação, onde também observa-se maior profundidade de penetração de luz, aumento de reflexão nas primeiras camadas da resina e na própria superfície da amostra, sugerindo assim, a presença de biofilme.

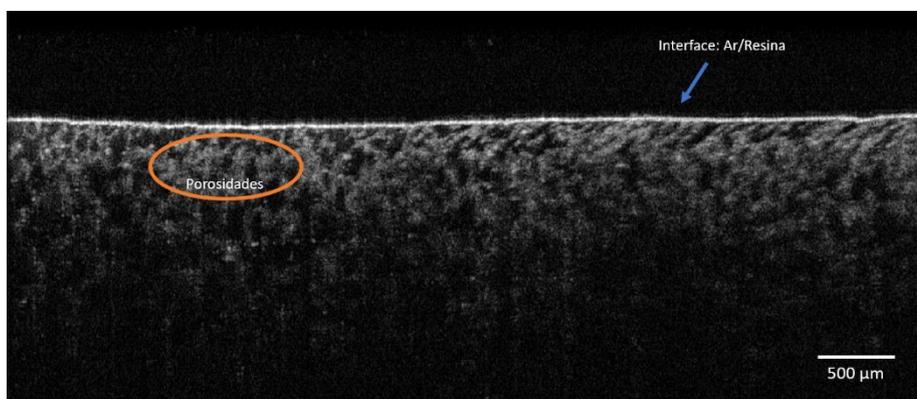


Fig. 33. Resina Lucitone não-polida anterior à inoculação com *Streptococcus aureus*.

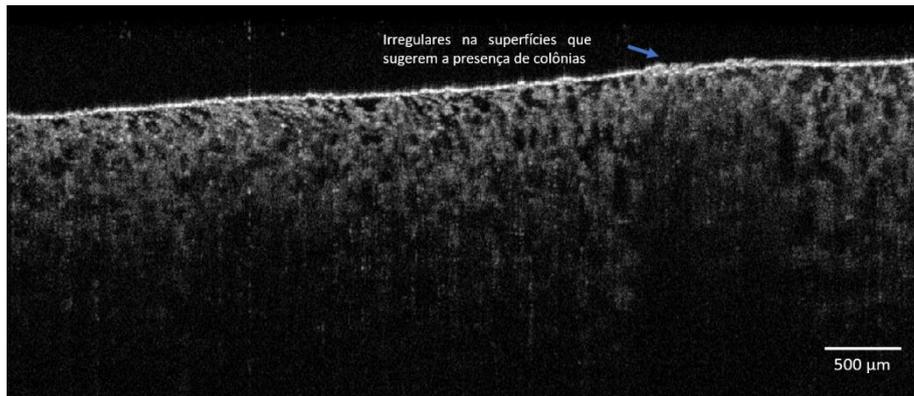


Fig. 34. Resina Lucitone não-polida posterior à inoculação com *Streptococcus aureus*.

De acordo com a análise estatística, as amostras de resina VipiCril Plus e Lucitone 550 mostraram uma diminuição nos valores de rugosidade de superfície após o polimento, e estas diferenças de valores foram estatisticamente significativas, com $p=0,005$.

Tabela 1. Medidas descritivas da rugosidade antes e após o polimento das resinas acrílicas.

Grupo	Momento	N	Média ± Desvio Padrão (μm)	p-valor
VipiCril	Antes do polimento	10	4.193,40 ± 448,80	0,005 ^{1*}
	Após o Polimento	10	355,60 ± 230,91	
Lucitone	Antes do polimento	10	4.873,40 ± 589,80	0,005 ^{1*}
	Após o Polimento	10	422,80 ± 252,22	

1- Teste não paramétrico de Wilcoxon; * Estatisticamente significante ($p<0,05$).

As resinas Coe-Comfort e Soft-Comfort não foram submetidas à polimento mecânico, apenas foi realizada aplicação de glaze, como recomendado pelo fabricante. Para o grupo de amostras Soft-Comfort, a aplicação do glaze conseguiu reduzir os valores de rugosidade de maneira significativa ($p=0,005$). Já no grupo Coe-Comfort, a diferença dos valores de rugosidade, antes e depois do glaze, não foi estatisticamente significativa ($p=0,333$).

Tabela 2 - Medidas descritivas da rugosidade antes e após o polimento das resinas de reembasamento.

Grupo	Momento	N	Média ± Desvio Padrão (µm)	p-valor
Soft-Comfort	Antes do polimento	10	2.740,60 ± 918,49	0,005 ^{1*}
	Após o Polimento	10	333,80 ± 156,17	
Coe-Comfort	Antes do polimento	10	3.966,00 ± 1.167,39	0,333 ^{1*}
	Após o Polimento	10	3.742,00 ± 914,60	

1- Teste não paramétrico de Wilcoxon; * Estatisticamente significante (p<0,05).

Com relação à porosidade, as resinas acrílicas apresentaram valores semelhantes entre si, assim como as resinas de reembasamento. O grupo que apresentou maiores valores de porosidade foi o Soft-Comfort.

Tabela 3 - Medidas descritivas da Porosidade após o polimento entre os grupos.

Variável	Grupo	N	Pos-Hoc ³	Média ± Desvio Padrão (µm)	Mínimo	Máximo	P valor
Porosidade (Face não polida)	VipiCril	10	A	0,54309 ± 0,00972	0,52445	0,56199	0,001
	Lucitone	10	A	0,53783 ± 0,01017	0,51899	0,55492	
	Soft-Comfort	-	-	-	-	-	
	Coe-Comfort	-	-	-	-	-	
Porosidade (Face Polida)	VipiCril	10	A	0,53381 ± 0,00493	0,52658	0,53985	0,002
	Lucitone	10	A	0,55742 ± 0,01001	0,53707	0,57340	
	Soft-Comfort	10	B	0,62788 ± 0,03941	0,57311	0,68858	
	Coe-Comfort	10	A	0,52488 ± 0,00696	0,51350	0,53637	

1-Teste de Kruskal Wallis; 2-Teste não paramétrico de Mann-Whitney; 3-Letras iguais não diferem com significância estatística.

Os valores de porosidade e rugosidade das amostras foram correlacionados e foi verificado que, excetuando-se as amostras VipiCril Plus, nenhum dos outros grupos apresentou correlação estatisticamente significativa, ou seja, em ambos os lados da amostra, polido e não polido, os valores médios de porosidade foram semelhantes. Para as amostras VipiCril foi observado que à medida que a rugosidade aumenta, a porosidade também aumenta.

Tabela 04 - Correlação entre Rugosidade após o polimento e a porosidade em cada grupo.

Grupo	Variáveis	Correlação	p-valor¹
VipiCril	Rugosidade x Porosidade	0,630	0,050
Lucitone	Rugosidade x Porosidade	0,121	0,738
Soft-Comfort	Rugosidade x Porosidade	-0,503	0,139
Coe-Comfort	Rugosidade x Porosidade	-0,183	0,614

1-Significância do coeficiente de correlação de Pearson

5 DISCUSSÃO

A resina acrílica é um material polimérico amplamente utilizado na Odontologia, especialmente na confecção de diferentes tipos de dispositivos protéticos, sendo o principal material que compõe as bases protéticas e os dentes artificiais. ^(35,36) A adsorção de microrganismos por este tipo de material é frequente e indesejável em função da contínua exposição de seus usuários aos agentes biológicos, que podem ser determinantes de doenças locais e sistêmicas ^(9,36). Há evidências científicas de que as próteses podem acumular patógenos respiratórios associados ao desenvolvimento de pneumonia, condição que acomete em larga escala a população geriátrica, a mais contemplada por essa modalidade de tratamento. ^(37,38)

Estudos in vivo mostraram que uma vez unidos às superfícies irregulares, os microrganismos do biofilme podem sobreviver por longos períodos de tempo devido às irregularidades da superfície os protegerem das forças de remoção provenientes da mastigação, fluxo salivar e, até mesmo, da ação mecânica da escovação. ^(39,40) O crescimento em forma de biofilme é um fator de patogenicidade do microrganismo, pois sua formação dificulta a penetração de agentes antimicrobianos. Bactérias podem ter sua resistência a agentes antimicrobianos até mil vezes maior quando crescidas em biofilme do que em comparação ao crescimento em forma planctônica. ⁽⁴¹⁾

Dessa maneira, torna-se relevante conhecer o padrão de rugosidade e porosidade das resinas utilizadas para a confecção de bases protéticas. O presente estudo avaliou a rugosidade e a porosidade de duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (VipiCril Plus e Lucitone 550) e duas resinas reembasadoras (Soft-Comfort e Coe-Comfort).

De acordo com os resultados encontrados através da análise estatística, a relação entre rugosidade e porosidade não é interdependente. A rugosidade está relacionada às características superficiais da resina acrílica após o processamento, podendo ser alterada pelos procedimentos de polimento e cuidados de higiene do usuário com a prótese. Já a porosidade, refere-se a presença de poros no interior da resina e não pode ser alterada, uma vez que a prótese esteja polimerizada. Observou-se assim, que o aumento da rugosidade não está relacionado ao aumento da

porosidade, exceto no grupo da resina VipiCril, onde estas duas medidas estavam relacionadas de maneira estatisticamente significativa.

O grupo que apresentou menor rugosidade foi o da resina Soft-Comfort, dado contrário aos achados da literatura, os quais sugerem que as resinas de caráter resiliente são mais rugosas que as acrílicas, em virtude da sua composição química. Por apresentarem características de absorção e solubilidade, os materiais resilientes têm suas propriedades físicas alteradas quando em meio bucal, o que provoca alterações dimensionais, distorções e gera mudanças contínuas durante o uso oral.^(42,43,44) Entretanto, o dado de rugosidade obtido no presente estudo pode ter sido alterado, em virtude da maneira como as amostras de resina reembasadora foram confeccionadas, já que a prensagem das resinas (acrílica termopolimerizável para a base e reembasadora para forramento) foi feita em um único momento. É necessário que novas amostras sejam confeccionadas para que os valores encontrados sejam confirmados.

Por outro lado, essa mesma resina reembasadora apresentou os maiores valores de porosidade. Isso provavelmente aconteceu pelo fato da resina Soft-Comfort ser autopolimerizável, onde a polimerização nunca é tão completa quanto a das resinas do tipo ativadas termicamente. A razão disto é que 3 a 5% da resina ativada quimicamente é composta por monômeros livres que podem evaporar e causar porosidade⁽⁴⁵⁾. Dessa forma, o material poderá aumentar seu grau de porosidade pela associação da perda dos plastificantes com o passar do tempo. Esse mecanismo acaba tornando o material ainda mais poroso e endurecido, o que favorece o acúmulo de detritos e biofilme^(46,47).

O acúmulo biofilme nas próteses favorece o desenvolvimento da estomatite protética, infecção fúngica causada por *Candida*. Alguns estudos sugerem que a estomatite protética está mais associada ao crescimento de *Candida* na base da própria prótese do que na mucosa. Assim, fabricantes de resina incorporaram antifúngicos em sua composição, como a resina Coe-Comfort, resina resiliente e de caráter temporário, utilizada neste estudo. A adição de antifúngicos às resinas ainda é um assunto controverso, já que é possível que os compostos antimicrobianos aumentem a dureza dos condicionadores de tecidos; e que o revestimento superficial dos mesmos possa impedir a liberação dos antifúngicos.⁽⁴⁷⁾ Entretanto, no presente estudo observou-se a inibição do crescimento de colônias de *Candida* nas amostras

que continham o antifúngico em sua composição, o que demonstra a efetividade e benefício da adição destes, no que diz respeito ao controle de desenvolvimento de infecções fúngicas.

Um outro problema associado ao uso de próteses, além da possível instalação de doenças por bactérias ou fungos presentes no biofilme, é a dificuldade em conscientizar o paciente sobre as condutas de higienização para a própria prótese e para a cavidade bucal. Podem ser utilizados evidenciadores de biofilme, entretanto, estes por vezes não tem boa capacidade em corar, são de difícil remoção e podem apresentar algum tipo de atividade antimicrobiana ⁽¹⁷⁾, o que resultaria em dados imprecisos sobre a quantidade e localização do biofilme nas próteses. Assim, buscam-se meios facilitadores dessa visualização de microrganismos, sem que seja necessário a realização de um exame de cultura ou confecção de uma lâmina para estudo em microscópio.

A técnica OCT, utilizada neste estudo para avaliação de biofilme formado por *Candida albicans* e *Streptococcus aureus*, pode ser uma alternativa para a visualização de biofilme de maneira mais rápida e prática. Corroborando com a idéia proposta, imagens de OCT já foram utilizadas para verificar a formação de biofilme de *Candida* em amostras de resina acrílica ⁽¹⁹⁾. Tais imagens permitem a análise em profundidade da estrutura, sem ser invasivo e com necessidades mínimas de manipulação ⁽²⁵⁾. A técnica tem-se mostrado adequada especialmente para uso em biofilme produzido por *Candida albicans*, pelo fato desta levedura apresentar hifas que se ramificam e crescem em profundidade ⁽¹⁹⁾, e por não necessitar de processamento para desidratação, como na microscopia eletrônica de varredura. A desidratação faz com que a maior parte da matriz exopolimérica do biofilme seja perdida. ⁽¹³⁾

Em estudo recente, foi avaliada a estrutura de biofilme de *Candida* no interior de cateteres através do OCT, e foi observado que a presença do biofilme de *Candida* causa alterações na dispersão da amostra, aumentando o brilho da área abaixo da superfície do cateter nas imagens do OCT. A dispersão foi atribuída a microestrutura do biofilme. O estudo descreve ainda como vantagens, o fato do biofilme manter sua estrutura original e poder ser avaliado quanto a sua rugosidade e área de superfície. ⁽²⁰⁾

No presente estudo, nas imagens obtidas das resinas contaminadas foi observada uma diferença na penetração, espalhamento de luz e no tamanho dos

poros. A observação das possíveis colônias de microrganismos torna-se de melhor visualização nas resinas reembasadoras, onde o espalhamento de luz nas imagens das amostras esterilizadas é pequeno, favorecendo a análise comparativa com as imagens obtidas após inoculação. Já nas resinas acrílicas, a presença de poros bem definidos dificultam a visualização das colônias, que podem ser observadas pelo aumento da profundidade de penetração de luz, aumento da reflexão de luz abaixo da superfície da resina, e pela aparente diminuição do tamanho dos poros, sugerindo o crescimento dos microrganismos no interior das porosidades.

Observou-se ainda que as imagens das resinas inoculadas com *Candida albicans* e *Streptococcus aureus* apresentaram maior penetração e espalhamento de luz em regiões internas, em geral abaixo da superfície da amostra, corroborando com os dados achados na literatura e sugerindo que o OCT é uma técnica adequada para visualizar biofilme em resinas acrílicas e reembasadoras, independente do tipo de microrganismo.

Além disso, observa-se que o crescimento da *Candida* acontece nas camadas mais superficiais do epitélio, o que permite que, adicionalmente, o OCT possa ser utilizado tanto para avaliar a prótese quanto para avaliar a mucosa oral.

Entretanto, não foram encontrados outros estudos na literatura que utilizassem o OCT para visualizar biofilme em resinas acrílicas e reembasadoras, ou em mucosa oral, sendo necessária a realização de mais estudos para corroborar os resultados aqui apresentados.

6 CONCLUSÕES

- Os valores de rugosidade das resinas acrílicas reduziram significativamente após o polimento, enquanto, as resinas reembasadoras mostraram valores semelhantes antes e após o polimento.
- Não há correlação entre os valores de rugosidade e porosidade das resinas;
- O OCT é um meio viável para visualizar biofilme formado por *Candida albicans* e *Streptococcus aureus* em resinas utilizadas na confecção de bases protéticas.

REFERÊNCIAS

1. Tyrovolas S, Koyanagi A, Panagiotakos DB, Haro JM, Kassebaum NJ, Chrepa V, Kotsakis GA. Population prevalence of edentulism and its association with depression and self-rated. 2016.
2. BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2010: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira, Resultados Principais. Brasília, MS, 2011.
3. Naylor WP, Manor, RC. Fabrication of a flexible prosthesis for the edentulous escleroderma patient with microstomia. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1983; 50: 536-538.
4. De Paula V. Próteses Parciais Removíveis não Convencionais- Parte I. *Full Dentistry in Science*. 2011; 2(7): 284-293.
5. Leles CR, Melo M, Oliveira MMM. Avaliação clínica do efeito da prótese parcial removível sobre a condição dental e periodontal de desdentados parciais. *ROBRAC*. 1999; 25(8):8-14.
6. Kuhar M, Funduk N. Effects of polishing techniques on the surface roughness of acrylic denture base resins. *Journal of Prosthetic Dentistry, St Louis*. 2005; 93(1): 76-85.
7. Laia CP, Tsaia MH, Chena M, Chang HS, Tay HH. Morphology and properties of denture acrylic resins cured by microwave energy and conventional water bath. *Dental Materials, Washington*. 2004; 20(2):133-41.
8. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: A literature review. *Journal of Prosthetic Dentistry, St Louis*. 2005; 93(3):288-93.
9. Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology, Mount Desert*. 2006; 23 (2): 111-6.
10. Cheng Y, Sakai T, Moroi R, Nakagawa M, Sakai H, Ogata T, Terada Y. Self-cleaning ability of a photocatalyst-containing denture base material. *Dent Mater J*. 2008; 27(2):179-86.
11. Murata H, Hamada T, Djulaeha E, Nikawa H. Rheology of tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1998; 79:188–199
12. Lenoir S, Pagnouille C, Galleni M, Compère P, Jérôme R, Detrembleur C. Polyolefin matrixes with permanent antibacterial activity: preparation, antibacterial activity, and action mode of the active species. *Biomacromolecules*. 2006; 7: 2291-6.
13. Senna AM. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no Tratamento da Estomatite Protética. [Tese – Doutorado] – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. São Paulo, 2012.
14. Lang NP, Ostergaard E, Løe H. A fluorescent plaque disclosing agent. *J Periodontol Res*. 1972; 7:59-67.
15. Lecknes KN, Lie T. Erythrosin staining in clinical disclosure of plaque. *Quintessence Int*. 1988; 19(3):199-204.
16. Miese JB, Wade AB. Use of food colorants of plaque disclosing agents. *J Clin Periodontol*. 1973; 3:200-7.

17. Silva CHL, Paranhos HFO, Ito IY. Evidenciadores de biofilme em prótese total: avaliação clínica e antimicrobiana. *Pesqui. Odontol. Bras. São Paulo.* 2002; 16 (3).
18. Palenik CJ, Miller C. H. In vitro testing of three denture cleaning systems. *J Prosthet Dent.* 1984; 51(6):751-4.
19. Suzuki, LC. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. [Dissertação-Mestrado] – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. São Paulo, 2009.
20. Andrade MCL, Oliveira MAS, Santos FAG, Vilela PBX, Silva MN, Macedo DPC, Neto RGL, Neves HJP, Brandao ISL, Chaves GM, Araujo RE, Neves RP. A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *Plos One.* 2017;12(11):2-12.
21. Mota CCOM, Gueiros LA, Maia AMA, Santos-Silva AR, Gomes ASLG, Alves FAA, Leão JC, Freitas AZ, Goes M, Lopes MA. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2013; 31(7): 301-306.
22. Amaechi BT, Higham SM, Podoleanu AGH, Rogers JA, Jackson DA. Use of optical coherence tomography for assessment of dental caries: quantitative procedure. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2001. 28:1092-1093.
23. Baumgartner A, Dichtl S, Hitzemberger CK, Sattmann H, Robl B, Moritz A, Fercher AF, Sperr W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Research.* 2000. 34(1):59-69.
24. Colston JR, Everett MJ, Da Silva LB, Otis LL, Stroeve P, Nathel H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. *Applied Optics.* 1998. 37(16); 3582-3585.
25. Monteiro GQM, Montes MAJR, Rolim TV, Mota CCBO, Kyotoku BBC, Gomes ASL, Freitas AZ. Alternative methods to determine shrinkage in restorative resin composites. *Dental Materials.* 2011; 27:176-185.
26. Fried D, Xie J. Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics.* 2002; 7(4): 618-627.
27. American Dental Association. Specification nº 12 for denture base polymers. *J. Am. Dent. Assoc.* 1975; 90 (2): 451-458.
28. Rashid H, Sheikh Z, Vohra F. Allergic effects of the residual monomer used in denture resin acrylic resins. *Eur. J. Dent.* 2015; 9(4): 614-619.
29. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ – *Manual of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology. 1985; Washington, D.C.
30. Filho AP. Rugosidade Superficial, 3º Seminário de Metrologia da Universidade Federal de Uberlândia. 2011.
31. Leitao J, Hegdahl T. On the Measuring of Roughness. *Acta Odonto Scand.* 39(6):379-384, 1981.
32. Tavares LRS. Recuperação de áreas degradadas: a visão da Ciência do Solo no contexto do diagnóstico, manejo, indicadores de monitoramento e estratégias de recuperação. Embrapa, 2008
33. Campello SL, Santos WP, Machado VF, Mota CCBO, Gomes ASL, Souza RE. Micro-structural information of porous materials by optical coherence tomography. *Microporous and Mesoporous Materials.* 2014; 198:50–54.

34. Neppelenbroek KH, Kuroishi E, Hotta J, Marques VR, Moffa EB, Soares S, Urban VM. Surface properties of multilayered, acrylic resin artificial teeth after immersion in staining beverages. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(4):376-82.
35. Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 2005; 93:483-487.
36. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miaymoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerontology.* 2003; 20(2): 84-87.
37. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring cases. *Gerontology.* 2003; 49(5): 301-309.
38. Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7:201-11.
39. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral and Maxillofac Implants.* 1996;11:169-78.
40. Dow JAT, Davies SA. Integrative physiology and functional genomics of epithelial function in a genetic model organism. *Physiol. Rev.* 2003; 83(3): 687-729.
41. Bates JF, Smith DC. Evaluation of indirect resilient liners. *J Am Dent Assoc.* 1965; 70(2):344-53.
42. Feitosa MAL, Vasconcelos LMR, Garcia RCMR, Cury AADB. Efeito dos limpadores químicos de próteses sobre o peso de reembasador resiliente temporário. *RPG Rev Pós Grad.* 2003;10(3):199-203.
43. Murata H, Taguchi N, Hamada T, Kawamura M, McCabe JF. Dynamic viscoelasticity of soft liners and mastigatoy function. *J Dent Res.* 2002;81(2):123-8.
44. Phillips RW. *Materiais dentários de Skinner.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
45. Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979; 42 (6):619-23.
46. Guiotti AM, Goiato MC. Silicones para próteses faciais: efeito da desinfecção química sobre dimensão e superfície. *Cienc Odontol Bras.* 2004;7(1):93-103
47. Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 1985; 12: 177-82.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Optical coherence tomography evaluation of biofilm formed by *Candida albicans* and *Streptococcus aureus* in removable dentures

Mayra Macêdo de Aquino^{1*}, Cláudia C. B. de O. Mota², Anderson S. L. Gomes^{1,3}

¹ Graduate Program of Dentistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil;

² Faculty of Dentistry, Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru, Brazil;

³ Department of Physics, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil;

[*mayra_maquino@hotmail.com](mailto:mayra_maquino@hotmail.com), corresponding author

Abstract

In this work, optical coherence tomography (OCT) was employed to evaluate biofilm created by microorganism in complete dental prostheses. Four resins (Coe-Comfort[®], Soft-Comfort[®], VipiCril Plus[®], Lucitone 550[®]) were divided into four groups (n = 10), polymerized and polished according to the manufacturers' guidelines. The samples were subjected to OCT scanning before and 96h after inoculation with *Candida albicans* and *Streptococcus aureus*. The biofilm evaluation was made in a qualitative way through 2D optical images. The biofilm formed was clearly visualized and its thickness measured, besides observation of porosity according to the material employed. The results of the present study suggest that OCT is a viable technique to visualize the biofilm, besides allowing a view of the internal structure of the material and providing porosity data.

Introduction

The colonization of microorganisms is a problem that occurs almost in the totality of removable prostheses. This is because, in addition to the characteristics of the rehabilitation materials themselves, most of the users of dental prostheses fail to maintain an appropriate cleaning of their prostheses. Thus, the prostheses can function as a reservation of microorganisms and favor the development or maintenance of local and systemic infectious. Evaluation and quantification of biofilm formation in prostheses is still in need of appropriate methods [1,2]. In some investigations, evidentiary solutions were used to quantify biofilm [3,4]. Recently, Optical Coherence Tomography (OCT) was cited as a possible means to visualize and evaluate biofilm in elastomeric discs and acrylic resin, both of which are contaminated with *Candida albicans* [5,6].

Currently, the OCT technique can be used to perform structural images of hard and soft tissues from the interior of the oral cavity, making it a valuable resource for investigating structural changes in biological tissues or dental materials. The results of recent studies indicate that OCT can produce high resolution images in a substantial number of applications, demonstrating the viability of this technique as a new imaging tool for the medicine and dental community, and provide images of carious dental lesions, restoration failures, diagnosis of periodontal diseases and oral pathology in studies in vitro and in vivo [7-10].

The present work evaluated adhesion of microorganisms in two types of resin (acrylic and reline), using the optical coherence tomography technique, seeking to identify if this constitutes a viable means to identify biofilm.

Materials and Methods

A laboratory experimental study was performed. Four types of prosthesis base resin, two thermo-polymerizable acrylic resins and two reline acrylic resins were studied, as described in Table 1:

Table 1. Description of acrylic resins selected for evaluation.

Product	Trade Mark	Manufacturer	Polymerization	Color
Acrylic resin	Lucitone 550	Dentsply	Thermosetting	Light Pink
Acrylic resin	VipiCril Plus	VIPI	Thermosetting	Medium Pink
Reline	Coe-Comfort	GC America	Self-curing	Incolor
Reline	Soft-Comfort	Dencril	Self-curing	Pink

The study employed four groups (1 for each resin trade mark), each group containing 10 samples ($n = 10$). The sample size was of convenience. For the uniformity of the samples, a rectangular metal matrix was used, the dimensions being in accordance with what is recommended by the American Dental Association (ADA). [11] The resins were processed according to the guidelines of each manufacturer by thermal curing. The polishing was also carried out following the manufacturer's instructions.

Sample contamination and imaging procedure

For the contamination of the specimens, a bacterium and a yeast were used, assigned by the Laboratory of Biophotonics and Applied Materials in Dentistry, Faculty ASCES (Table 2). After inoculation, was standardized to 108 colonies forming units / ml, equivalent to 0.5Mac Farland scale. The sterilized specimens were placed in test tubes containing 5 mL of Sabouraud dextrose (SD) broth for the yeasts and 5 ml of Tryptone Broth (TSB) for the bacteria, and inoculated with the selected microorganisms. These tubes were incubated in a microbiological oven for 96 hours for the yeast and for the bacteria at 37 °C. During this period, a culture medium was exchanged after 48 hours to maintain the broth nutrients viable for the yeasts; and two exchanges of culture medium, after 32 hours, for the bacteria. Then the specimens were removed and let to dry off in Petri dishes to perform the readings in the OCT.

Aliquots of the broth were removed and seeded in a solid culture medium Sabouraud Agar for yeasts, or Mueller Hinton Agar for bacteria, with Petri dishes being incubated at 37°C for 24 or 48 hours. Next, was performed the enumeration of colony forming units per milliliter (CFU / mL) of both yeast and bacteria.

Table 2: Strains of bacteria and yeasts

<i>Microorganism</i>	<i>Identification</i>	<i>Morphotintiorial Characteristics</i>
<i>Streptococcus aureus</i>	UFPEDA 02	Cocos Gram-positivos
<i>Candida albicans</i>	URM 6547	Leveduras

Three cycles of inoculation of the samples were performed for both the bacteria and the yeast. After each inoculation, the resin samples were sterilized and re-inoculated with a novel microorganism from the strain already described. In the third cycle, half of the samples were immersed in culture medium (TSB and SD) and water to obtain a standard of comparison with the inoculated samples. Then, in each resin group, two samples were immersed in TSB, two in SD and one in water.

Samples analysis

The samples were submitted to analysis through optical coherence tomography in 2 moments, before and after the culture period of microorganisms.

To obtain the images, OCT (Callisto 930 nm-Thorlabs Inc) was used to evaluate the structure of acrylic and reline resins, before and after inoculation with microorganisms, looking for structural alterations at the surface and inside the samples. For this purpose, a 2D image was obtained by combining depth resolution and light scattering intensity profiles along the section of interest in the sample. The imaging system used exploits a super luminescent diode as a light source infrared light emitter, wavelength centered at 930 nm, spectral width of 100 nm, axial resolution in the air of 7 μm and generates images composed of 2000 columns and 512 lines [12,13].

Results

Initially, aliquots of the sterilized culture broth and aliquots of the contaminated broth were taken to OCT. In Figure 1, can be visualized one drop of the sterilized broth and in Figure 2, one drop of the broth contaminated with *Streptococcus aureus*. Differences between the two images below are observed regarding the increase of incident light scattering and light penetration in the region below the surface of the bacteria-containing broth, which was repeated in the images of the inoculated resin samples.

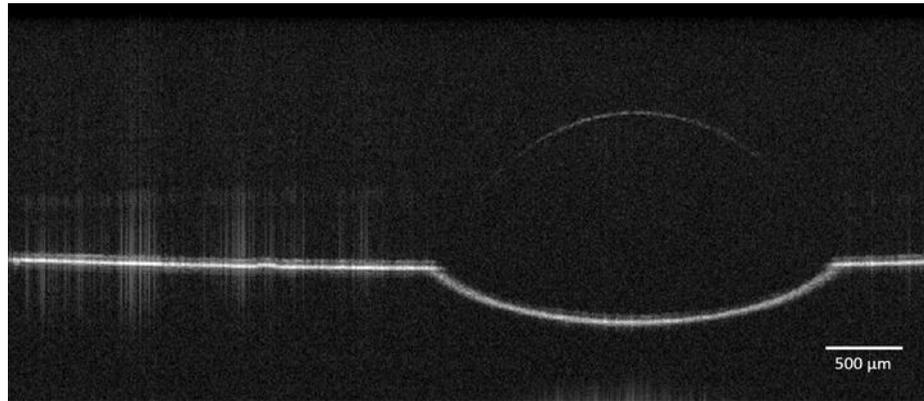


Fig. 1. Sterilized TSB broth aliquot. Scale bar represents 500μm

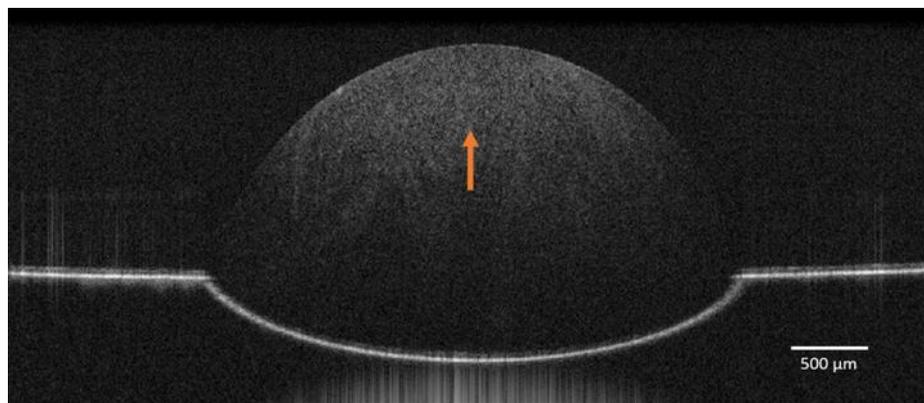


Fig.2. TSB Broth aliquot containing Streptococcus Aureus. Increased light scattering

Then, images of the resin samples were performed and evaluated qualitatively.

The figures 3, 4 and 5 are images of the Soft-Comfort resin. The first (Fig. 3) was performed before inoculation with *Candida albicans*, where the resin surface and its internal structure are observed. In Figure 4, the Soft resin sample was immersed in culture medium without microorganism, resulting in the formation of a well delimited area in the first layers of the sample surface, where it is observed a greater intensity of scattering of light. In figure 5, the image was obtained after inoculation with *Candida*

albicans. It was observed that the first resin layers were impregnated by means of culture and fungal collection, however the pores of the resin are free from material, when compared to fig. 4, in which there is only culture medium. A well-defined white line, possibly resulting from the deposition of *Candida* and culture medium in the subsurface pores of the specimen, is also observed.

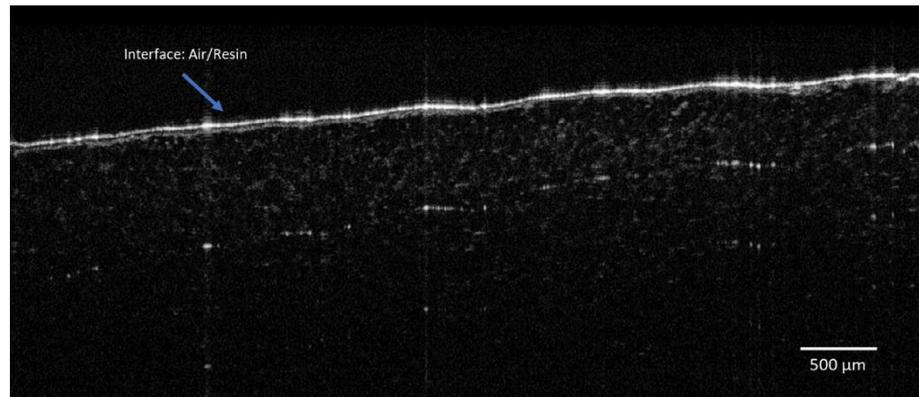


Fig. 3. Soft-Confort resin before inoculation with *Candida albicans*. Scale bar represents 500μm.

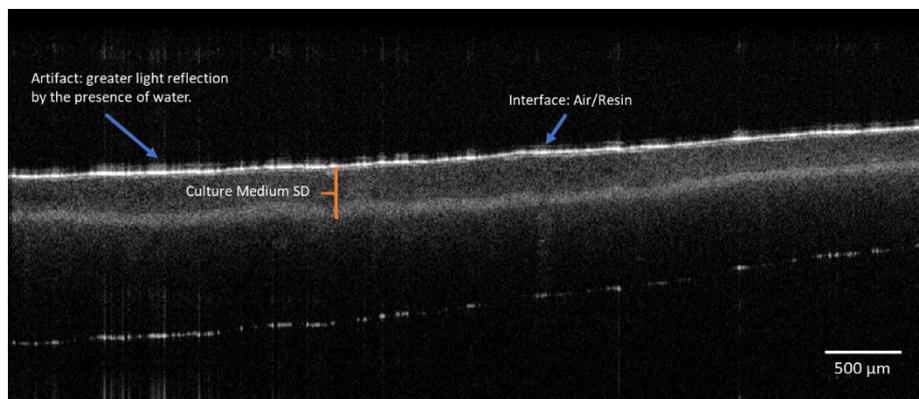


Fig.4. Soft-Confort resin immersed in SD culture medium. Formation of well delimited area with greater intensity of light scattering.

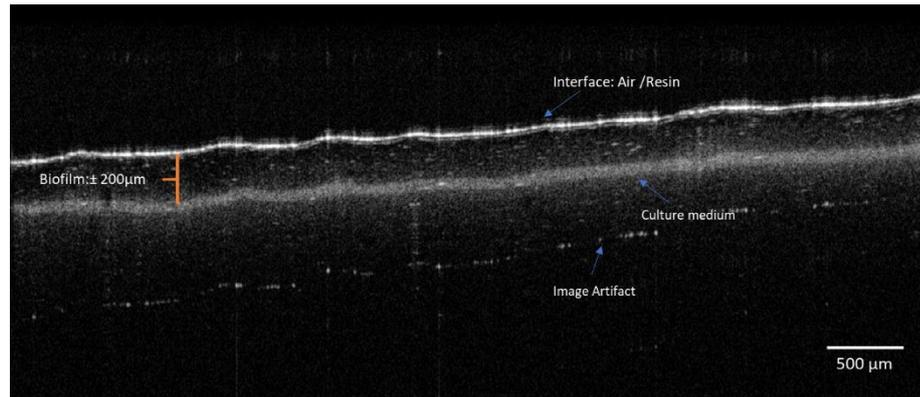


Fig. 5. Soft-Comfort resin after inoculation with *Candida albicans*. The presence of biofilm and culture medium is observed.

In Figures 6 and 7 the Coe-Comfort resin images can be visualized before and after inoculation with *Candida albicans*, respectively. Although Soft-Comfort and Coe-Comfort resins are classified as self-cured, resin-based acrylic resin materials, it is observed that their internal structure varies significantly due to differences in their compositions. For example, Coe-Comfort resin differs from Soft-Comfort because it has an antifungal in your formulation. Therefore, when comparing Coe-Comfort images before and after inoculation with *Candida albicans*, no differences were observed in the images.

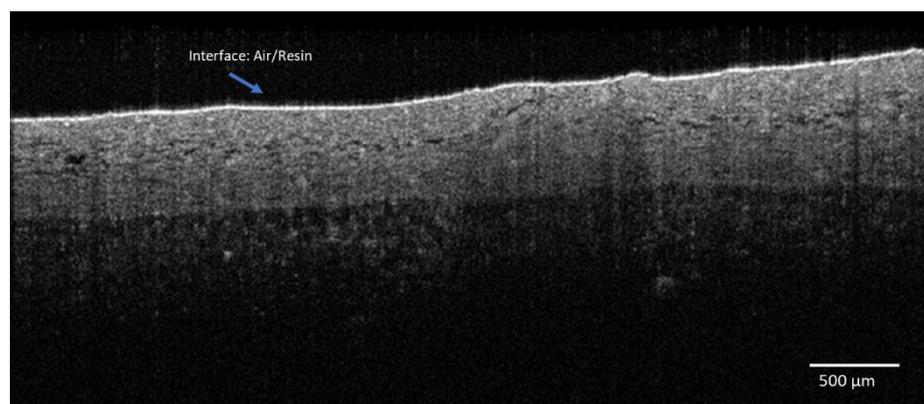


Fig.6. Coe-Comfort resin before inoculation with *Candida albicans*

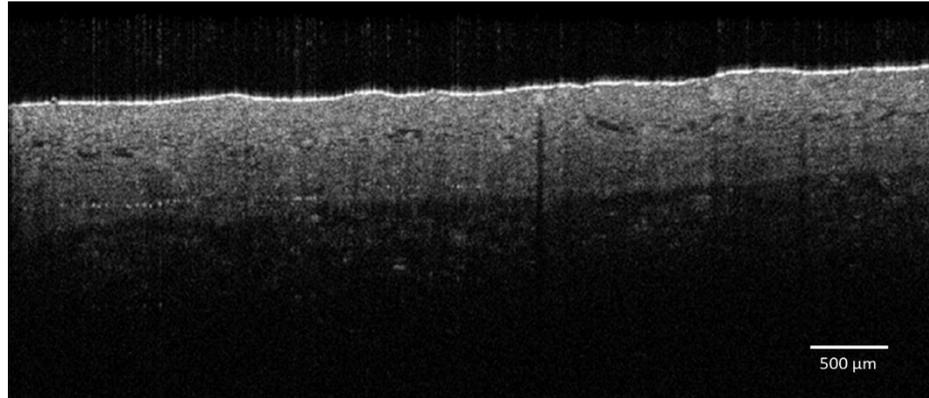


Fig.7. Coe-Comfort resin after inoculation with *Candida albicans*

The acrylic resin samples have, in their interior, a structure with more visible pores (Figures 8 to 11) than the relin resin, such porosities are inherent to the technique used to make the samples, which is the same technique used to make the complete dentures.

When inoculated with microorganisms, either *Streptococcus aureus* or *Candida albicans*, it is possible to visualize in the acrylic resin samples changes in the images related to the increase of light scattering in the region below the surface of the resin and the filling of the pores, which suggests biofilm deposition in the the first layers of the sample. Figure 8 shows the image of the unpolished surface of the acrylic resin VipiCril Plus before the inoculation, where the surface of the resin and the presence of porosities inside the sample can be identified. Figure 9 shows the image of the same face in the same sample, but after inoculation with *Streptococcus Aureus*, where a higher light reflection intensity can be visualized below the resin surface, suggesting the biofilm deposition in this region.

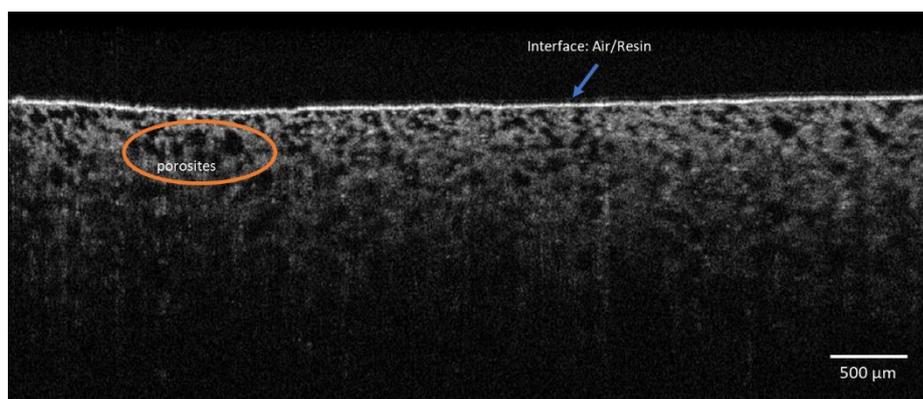


Fig. 8. Unpolished VipiCril resin before inoculation with *Streptococcus aureus*. It can be to view the porosities.

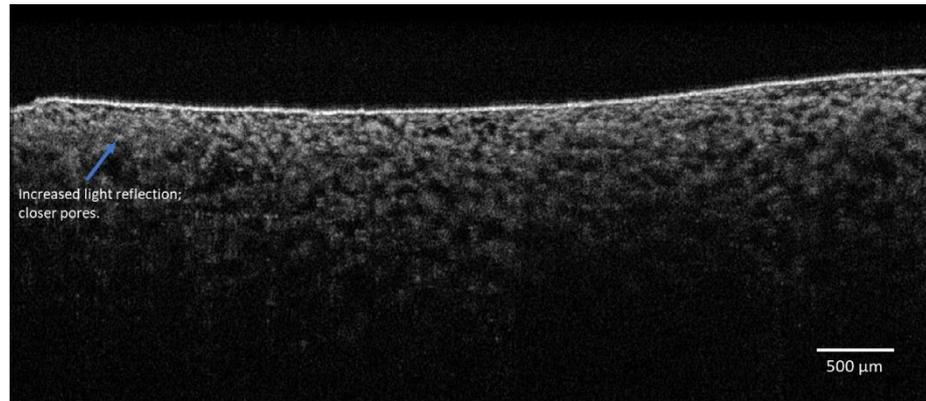


Fig.9. Unpolished VipiCril resin before inoculation with *Streptococcus aureus*.

In Figures 10 and 11, the unpolished side of the Lucitone acrylic resin is seen. Figure 10 corresponds to the image performed prior to inoculation with *Streptococcus aureus*. Figure 11 shows the image taken after inoculation, where it is also observed a greater depth of light penetration, increased reflection in the first layers of the resin and, now also on the surface of the sample, thus suggesting the presence of biofilm.

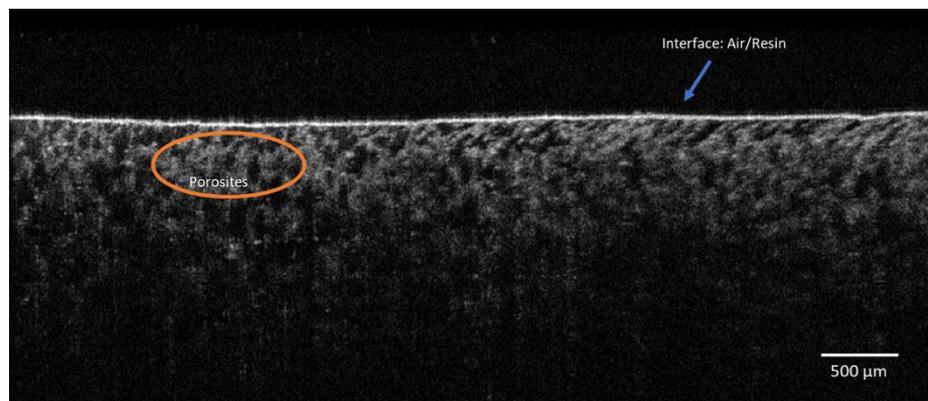


Fig. 10 Unpolished Lucitone resin before inoculation with *Candida albicans*

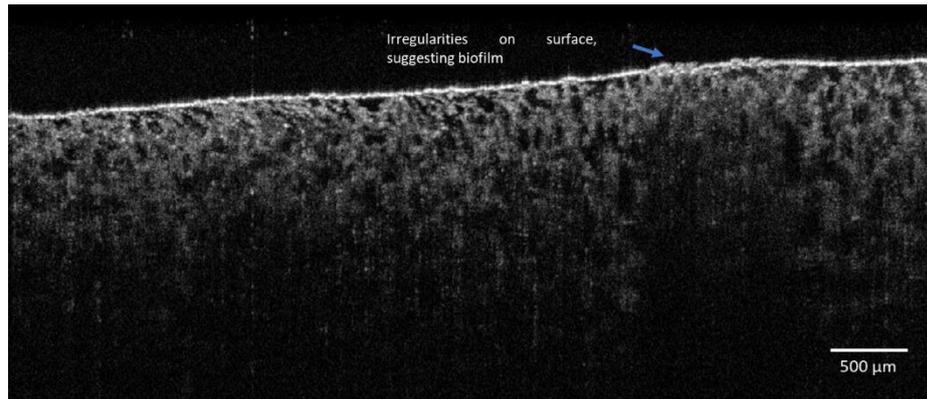


Fig. 11. Unpolished Lucitone resin after inoculation with *Candida albicans*

The difference between the images of the polished face of the acrylic resin samples was small, since the adhesion of microorganisms becomes difficult in these areas due to the increase of surface smoothness that prevents the adhesion of the biofilm by the decrease of the roughness of the resin.

Discussion

Acrylic resin is a polymeric material widely used in dentistry, especially in the manufacture of different types of prosthetic devices, being the main material that makes up the prosthetic bases and the artificial teeth [14,15]. The adsorption of microorganisms by this type of material is frequent and undesirable due to the continuous exposure of its users to biological agents, which can be determinants of local and systemic diseases [16]. There is scientific evidence that prostheses can accumulate respiratory pathogens associated with the development of pneumonia, a condition that affects the geriatric population, the most contemplated by this treatment modality. [15,17]

In the oral cavity, the accumulation of biofilm in prostheses favors the development of prosthetic stomatitis, a fungal infection caused by *Candida*. Some studies suggest that prosthetic stomatitis is more associated with the growth of *Candida* on the basis of the prosthesis itself than on the mucosa. [17]

Optical coherence tomography, used in this study, may be an alternative to the biofilm visualization in a quicker and practical way. Corroborating with the proposed idea, OCT images have already been used to verify the formation of *Candida* biofilm

in samples of acrylic resin [5]. Such images allow in-depth analysis of the structure, without being invasive and with minimal manipulation and processing needs [12], besides being suitable for use in biofilm produced by *Candida albicans* and not requiring processing for dehydration, as in scanning electron microscopy. Dehydration causes most of the exopolymeric matrix of the biofilm to be lost. [18]

In the images obtained through the OCT of contaminated acrylic resin and reliner, a difference was observed in penetration and light scattering, and in pore size. The observation of the possible colonies of microorganisms becomes of better visualization in the resins resins, where the light scattering in the sterilized samples is small, favoring the comparison after inoculation. In the case of acrylic resins, the presence of well-defined pores in the images makes it difficult to visualize the colonies that are observed by the increase in light penetration depth, the light reflection below the resin surface, and the apparent decrease in pore size, suggesting the growth of the microorganisms inside the porosities.

In a recent study, the structure of *Candida* biofilm inside catheters through the OCT was evaluated, and it was observed that the presence of the *Candida* biofilm improves the sample dispersion, increasing the brightness of the area below the catheter surface in OCT images. The dispersion was attributed to the microstructure of the biofilm. The study also describes as advantages the fact that the biofilm maintains its original structure and can be evaluated for its roughness and surface area. [13] This data is compatible with the findings of the present study, although different growth media and microorganisms.

It was observed that the images of the resins inoculated with *Candida albicans* and *Streptococcus aureus* showed greater penetration and light scattering in internal regions, below the surface of the sample, suggesting that the OCT is a suitable technique to visualize biofilm in acrylic and relin resins, independent of the type of microorganism. In addition, it is observed that *Candida* growth occurs in the superficial layers of the epithelium, which allows OCT additionally to be used both to evaluate the prosthesis and to evaluate the oral mucosa.

However, we did not find other studies in the literature that used the Optical Coherence Tomography technique to visualize biofilm in acrylic and relin resin, or in

oral mucosa, and it is necessary to perform further studies to corroborate the results presented here.

Conclusions

The OCT is a viable means to evaluate biofilm and to observe the degree of porosity; and by the qualitative evaluation, the adhesion of microorganisms happens more pronounced in the relined resins and in the unpolished side of the acrylic resins

Acknowledgements

This study is part of the INCT/INFO (National Institutes of Science and Technology – Photonics National Institute), supported by The Ministry of Science, Technology and Innovation and the Brazilian agencies CNPq, CAPES and FACEPE.

REFERENCES

1. Lang NP, Ostergaard E, L oe H. A fluorescent plaque disclosing agent. *J Periodontol Res.* 1972; 7:59-67.
2. Lecknes KN, Lie T. Erythrosin staining in clinical disclosure of plaque. *Quintessence Int.* 1988; 19(3):199-204.
3. Silva CHL, Paranhos HFO, Ito IY. Evidenciadores de biofilme em prótese total: avalia o clínica e antimicrobiana. *Pesqui. Odontol. Bras. São Paulo.* 2002; 16 (3).
4. Palenik CJ, Miller C. H. In vitro testing of three denture cleaning systems. *J Prosthet Dent.* 1984; 51(6):751-4.
5. Suzuki, LC. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. [Disserta o-Mestrado] – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares. São Paulo, 2009.

6. Andrade MCL, Oliveira MAS, Santos FAG, Vilela PBX, Silva MN, Macedo DPC, Neto RGL, Neves HJP, Brandao ISL, Chaves GM, Araujo RE, Neves RP. A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *Plos One*. 2017;12(11):2-12.
7. Mota CCOM, Gueiros LA, Maia AMA, Santos-Silva AR, Gomes ASLG, Alves FAA, Leão JC, Freitas AZ, Goes M, Lopes MA. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2013; 31(7): 301-306.
8. Amaechi BT, Higham SM, Podoleanu AGH, Rogers JA, Jackson DA. Use of optical coherence tomography for assessment of dental caries: quantitative procedure. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2001. 28:1092-1093.
9. Baumgartner A, Dichtl S, Hitzenberger CK, Sattmann H, Robl B, Moritz A, Fercher AF, Sperr W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Research*. 2000. 34(1):59-69.
10. Colston JR, Everett MJ, Da Silva LB, Otis LL, Stroeve P, Nathel H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. *Applied Optics*. 1998. 37(16); 3582-3585.
11. American Dental Association. Specification no 12 for denture base polymers. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 90, n. 2, p. 451-458, 1975.
12. Monteiro GQM, Montes MAJR, Rolim TV, Mota CCBO, Kyotoku BBC, Gomes ASL, Freitas AZ. Alternative methods to determine shrinkage in restorative resin composites. *Dental Materials*. 2011; 27:176-185.
13. Campello SL, Santos WP, Machado VF, Mota CCBO, Gomes ASL, Souza RE. Micro-structural information of porous materials by optical coherence tomography. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2014; 198:50–54.
14. Neppelenbroek KH, Kuroishi E, Hotta J, Marques VR, Moffa EB, Soares S, Urban VM. Surface properties of multilayered, acrylic resin artificial teeth after immersion in staining beverages. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(4):376-82.
15. Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2005; 93:483-487.
16. Pesci-Bardon C, Fosse T, Serre D, Madinier I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology*, Mount Desert. 2006; 23 (2): 111-6.

17. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerontology*. 2003; 20(2): 84-87.
18. Lenoir S, Pagnouille C, Galleni M, Compère P, Jérôme R, Detrembleur C. Polyolefin matrixes with permanent antibacterial activity: preparation, antibacterial activity, and action mode of the active species. *Biomacromolecules*. 2006; 7: 2291-6.