



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Departamento de Odontologia**  
**Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada**

---

**Rossano Vinícius Dala Rosa Silva**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE RESINA  
ACRÍLICA REVESTIDAS POR DIÓXIDO DE SILÍCIO - ESTUDO IN SITU**

**MARINGÁ**

**2019**



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Departamento de Odontologia**  
**Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada**

---

**ROSSANO VINÍCIUS DALA ROSA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE RESINA  
ACRÍLICA REVESTIDAS POR DIÓXIDO DE SILÍCIO - ESTUDO IN SITU**

Trabalho de dissertação apresentado ao programa de pós-graduação em  
Odontologia Integrada da Universidade  
Estadual de Maringá, como requisito para  
obtenção do título de mestre em  
Odontologia Integrada.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Corrêa Pascotto**

**MARINGÁ**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S586a Silva, Rossano Vinícius Dala Rosa  
Avaliação da adesão de biofilme em superfícies de resina acrílica revestidas por dióxido de silício - estudo *in situ* / Rossano Vinícius Dala Rosa Silva. -- Maringá, 2019.  
35 f. : il.

Orientador (a): Prof.a Dr.a Renata Corrêa Pascotto.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2019.

1. Microorganismos. 2. Resina acrílica. 3. Adesão celular. I. Pascotto, Renata Corrêa, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. IV. Título.

CDD 21.ed. 617.692

MAS-CRB 9/1094

**ROSSANO VINÍCIUS DALA ROSA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE RESINA  
ACRÍLICA REVESTIDAS POR DIÓXIDO DE SILÍCIO - ESTUDO IN SITU**

Trabalho apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de mestre em Odontologia Integrada. Orientadora: Profa. Dra. Renata Corrêa Pascotto

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

**Orientadora – PROFA. DRA. RENATA CORRÊA PASCOTTO**

Departamento de Odontologia / Universidade Estadual de Maringá – DOD/UEM.

---

**Examinador – PROFA. DRA. FLÁVIA MATARAZZO MARTINS**

Departamento de Odontologia / Universidade Estadual de Maringá – DOD/UEM

---

**Examinador – PROFA. DRA. MELYSSA FERNANDA NORMAN NEGRI**

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Estadual de  
Maringá – DAB/UEM

À minha querida avó Saleth Vecchi que, tenho certeza, está ao lado de Deus assistindo, com orgulho, este momento.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, a Deus, por me capacitar e abrir diversas janelas, nos momentos em que todas as portas parecem se fechar.

À minha mãe, meu pai, meu irmão e minha irmã e, é lógico que não poderia ficar de fora dessa, o Barney. Vocês sempre foram meu alicerce, o que me manteve de pé mesmo nos momentos de tribulações. Obrigado por me aconselharem, me motivarem, por terem paciência comigo nos momentos mais turbulentos. O agradecimento pelo amor e dedicação de vocês não é passível de ser colocado em palavras.

Ao meu primo Gustavo e aos amigos, pelas diversas vezes que me deram abrigo.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes nos momentos que precisei.

Aos meus companheiros de turma, Mariucha, Isa Rocha, Letícia Waleski, Marcelo, Yuri e Letícia Yuki, agradeço pela amizade e pelas risadas. Obrigado por fazerem parte de uma turma que jamais sairá da minha memória e será lembrada sempre com muito carinho.

Em especial, agradeço a Tereza, pelas incontáveis caronas, conversas e ajudas, sem as quais seria muito mais difícil chegar a esse momento; à Monique, pelas diversas injeções de ânimo, parceria e lições que me deu desde a graduação; finalmente, mas sem menor importância, à Isa Freitag, pelos diversos momentos que estivemos lado a lado no decorrer dos últimos dois anos, desde as mais simples caronas, até as sessões de desabafo e conselhos nos momentos difíceis. Mais que amiga, foi uma Isa anjo que Deus colocou na minha vida.

À Isabele Carrilho, por estar sempre pronta para me ajudar, independente do dia, sempre com disposição e muita competência.

À querida e prestativa Sônia, que sempre se colocou à disposição para ajudar e facilitar minha vida dentro do departamento.

À professora Melyssa, por toda a atenção, ajuda e suporte que me deu, sempre com muito carinho e atenção. Guardo sua orientação com muito afeto e gratidão.

À professora Flávia, por todo o conhecimento transmitido

À minha professora orientadora Renata, meus sinceros agradecimentos, pela orientação, ajudas, puxões de orelha e todos os ensinamentos valiosos que me passou. Principalmente pela contribuição nos últimos meses dessa jornada, que foram, sem dúvida, os mais difíceis para mim. Tenho certeza que nesse momento me orientar também foi um desafio, mas a maestria de uma ótima orientadora apareceu novamente e eu jamais me esquecerei disso.

A todos da fraternidade “O Caminho”, que foram de extrema importância para a conclusão dessa pesquisa.

À agência de fomento CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa e concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para este trabalho acontecer.

Contextualização	4
Resumo	6
Abstract	
1 Introdução	8
2 Material e Métodos	9
2.1 Preparação dos corpos de prova	9
2.2 Rugosidade superficial	9
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	10
2.4 Ângulo de contato	11
2.5 Exposição in situ	11
2.6 XTT	12
2.7 Cristal Violeta	12
3 Análise estatística	14
4 Resultados	14
5 Discussão	
6 Conclusões	



## CONTEXTUALIZAÇÃO

De acordo com a Organização mundial da Saúde (2001), o edentulismo é considerado uma deficiência física, comparada à ausência de partes importantes do corpo<sup>1</sup>. Traz como consequências dificuldades na realização de tarefas rotineiras, como falar e comer.

Dentre as formas de reabilitações orais mais comuns, as técnicas que utilizam resina acrílica são amplamente utilizadas no mundo todo. Porém, apesar dos benefícios da mastigação, fala e etc, essas próteses podem trazer maiores problemas, devido à falta de higiene, manutenção e qualidade do material utilizado.

De acordo com Coultheaite e Verran (2007)<sup>3</sup>, patógenos respiratórios preferem colonizar superfícies duras do que o tecido mole, sendo as próteses consideradas apoios para crescimento de microorganismos e desenvolvimento de placa bacteriana.

Le Bears et al. (2015)<sup>4</sup> fizeram uma revisão de literatura sobre a relação entre próteses totais e outras desordens sistêmicas, como câncer, doenças pulmonares, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças gástricas entre outras. Os achados indicam que pacientes com desordens sistêmicas, e, especial os com doenças no sistema digestivo, ou pulmonares, que fazem uso de prótese total encontraram mais frequentemente *Candida albicans* dentro da cavidade oral, em comparação com indivíduos saudáveis, e reforçam a importância da atenção para a higiene oral.

Para se ter uma ideia da influência dos microrganismos nas patologias orais, é importante citar um estudo realizado em 2011, por Gendreau et al.<sup>10</sup> Nessa pesquisa, foi constatada que a prevalência de estomatite protética pode variar de 15% a 70% dos usuários de próteses, dependendo das condições dos níveis de higienização.

Além dos fatores relacionados à saúde, é preciso mencionar o fato de que os microrganismos influenciam nas propriedades físicas das próteses. Essas alterações geram diminuição da resistência, aumento da rugosidade, mudanças de cores, e consequentemente, pior qualidade de vida para o paciente reabilitado.

Em 2001<sup>7</sup>, Lefebvre, atentou para os problemas de contaminação com microorganismos em próteses removíveis, focando-se em *Candida albicans*, e investigou a incorporação de triclosan nas superfícies de dentaduras. Utilizando discos de 5x1mm, com e sem o revestimento de triclosan, inseridos em meio com cepas de *C. albicans*. Após a

contagem de colônias, e análise estatística, concluiu que a adição do produto não alterou significativamente a citotoxicidade das próteses, nem reduziu a aderência dos microrganismos.

Um estudo *in vitro*, feito por Lamfon et al. (2005)<sup>9</sup>, analisando a susceptibilidade de biofilme em dentaduras a agentes antifúngicos, demonstrou que a exposição a agentes isolados como miconazol, fluconazol ou clorexidina, não inibiram o crescimento de *Candida* spp. O uso combinado de miconazol e clorexidina reduziu o crescimento de *Candida*, porém também ficou evidenciado o aparecimento de microrganismos resistentes aos agentes.

Peracini A., em 2009<sup>5</sup>, examinou o efeito de higienizadores de dentaduras nas propriedades físicas de resinas acrílicas termopolimerizáveis. Para isso, utilizou-se de sessenta espécimes fabricados com resina acrílica, imersos em diversos limpadores de dentaduras, simulando 180 dias de uso do produto. Os espécimes foram analisados utilizando-se colorímetros para observar mudanças de cores, rugosímetros para observar as mudanças na superfície e o teste de flexão de 3 pontos, para analisar a elasticidade. Foi observada mudanças de cor, rugosidade superficial e resistência. Concluiu-se que ocorreram mudanças perceptíveis na coloração, aumento da rugosidade superficial e diminuição da resistência das resinas acrílicas após a utilização dos produtos.

Straioto<sup>6</sup>, em 2010, tentou incorporar o polímero politetrafluoretileno em resina acrílica, para alterar as propriedades mecânicas da resina. Analisou-se a dureza, resistência, e força de impacto de resinas. Para isso, foram produzidos blocos de resinas com diferentes tempos de polimerização, que foram divididos em 4 grupos, separados pelo tempo de polimerização e pela presença ou não do polímero estudado. 40 blocos (10 de cada grupo) foram utilizados em cada teste. Foi concluído que o polímero não causou mudanças positivas na resina.

Silva et al.<sup>8</sup>, investigaram o uso de vinagre como agente antimicrobiano em próteses totais. Para tal, instruíram cinquenta e cinco pacientes, selecionados após entrevistas e exames clínicos detalhados, a manter as dentaduras imersas em solução de vinagre, durante toda a noite, por 45 dias. Foram colhidas amostras de saliva dos pacientes, antes e após o experimento, para contagem de CFU/ml. Concluiu-se que os banhos na solução de vinagre, apesar de não eliminarem a *C. albicans* da saliva, ou das próteses, reduziu a carga microbiana, o que foi correlacionado com uma redução dos casos de estomatite causada por *C. albicans*.

Percebe-se que existe um esforço constante, de vários anos, para desenvolver resinas de maior qualidade e um método eficaz de limpeza ou alteração na composição das resinas, para que a carga biológica das próteses seja reduzida com maior facilidade. Apesar do esforço, os resultados ainda deixam a desejar, tendo em vista que as alterações não apresentam melhoras significativas para os usuários finais das próteses.

Em 2016, Yarborough<sup>11</sup> realizou uma revisão sistemática avaliando estudos que apresentavam métodos de limpeza das próteses, que tinham como objetivo o de reprimir o aparecimento de estomatite protética. Os estudos que apresentam sucesso na redução da quantidade de microrganismos presentes nas próteses estão, geralmente, relacionados a métodos de limpeza químicos ou que dependem da destreza e disciplina do usuário da prótese<sup>11</sup>. Tendo em vista que grande parte dos pacientes reabilitados são idosos, e por consequência podem ter diminuição das habilidades técnicas necessárias para uma desinfecção efetiva, é de grande importância o desenvolvimento de próteses em que a diminuição da carga biológica independe da disciplina do paciente, e seja inerente às características físicas da própria prótese.

Em 2016 Mogensen et al.<sup>2</sup> avaliaram o uso do dióxido de silício como camada de revestimento em superfícies hospitalares. Nesse estudo *in situ*, foram analisados cinco revestimentos diferentes, entre eles o dióxido de silício, adicionados em descansos de braço no departamento de problemas pulmonares do Hospital Vendsyssel, na Dinamarca. Os microrganismos dessas superfícies foram analisados durante um período de 3 semanas, por meio de contagem de unidades formadoras de colônias por cm<sup>2</sup>, e concluiu-se que as superfícies revestidas com dióxido de silício foram as únicas capazes de serem limpas em um nível aceitável, abaixo do limite crítico, ao passo que as outras superfícies analisadas não.

Pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de técnicas as quais permitam que as próteses sirvam unicamente para reabilitação, sem o risco de se tornarem um reservatório de patógenos, podendo trazer riscos aos pacientes que necessitam utilizá-las.

## REFERÊNCIAS

- 1) World Health Organization. International Classification of Functioning, Disability, and Health (ICF). Geneva: World Health Organization, 2001.
- 2) Mogensen JE, Jørgensen P-E, Thomsen TR. A microbiological evaluation of SiO<sub>2</sub>-coated textiles in hospital interiors: The effect of passive coatings on the cleaning potential of interior textiles. *J Ind Text*. 2016 Aug;46:361–71.
- 3) Coulthwaite, L., & Verran, J. (2007). Potential pathogenic aspects of denture plaque. *British Journal of Biomedical Science*, 64(4), 180–189. Retrieved from
- 4) Le Bars P, Kouadio A, N'goran J, Badran Z, Soueidan A. Relationship between removable prosthesis and some systemics disorders. *J Indian Prosthodont Soc*. 2015;15:292.
- 5) Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, de Souza RF, da Silva CHL, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res [Internet]*. 2010 Apr [cited 2017 Sep 8];54(2):78–83.
- 6) Straioto, F. G., Ricomini Filho, A. P., Fernandes Neto, A. J., & del Bel Cury, A. A. (2010). Polytetrafluorethylene added to acrylic resins: Mechanical properties. *Brazilian Dental Journal*, 21(1), 55–59.
- 7) Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent [Internet]*. 2001 Apr [cited 2017 Sep 8];85(4):352–6.
- 8) Pinto, T. M. S., Neves, A. C. C., Leão, M. V. P., & Jorge, A. O. C. (n.d.). Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 16(6), 385–390. Retrieved from
- 9) Lamfon, H., Al-Karaawi, Z., McCullough, M., Porter, S. R., & Pratten, J. (2005). Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiology Letters*, 242(2), 345–351.
- 10) Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4), 251–260.

11) Yarborough, A., Cooper, L., Duqum, I., Mendonça, G., McGraw, K., & Stoner, L. (2016). Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 25(4), 288–301.

## RESUMO

A presença de biofilme sobre próteses dentárias confeccionadas em resina acrílica, pode provocar em prazo, mau hálito e inflamação gengival. Uma superfície que dificulte a aderência microbiana pode ter um efeito benéfico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso do dióxido de silício aplicado sobre a resina acrílica, na adesão de *microorganismos*. Foram confeccionados cento e vinte e seis blocos (5X5mm) de resina acrílica térmicamente ativada. Inicialmente, os blocos foram avaliados quanto a rugosidade superficial, por meio do perfilômetro. Todos os espécimes foram, então, aleatoriamente divididos em 2 grupos: GCT (controle) e GVL (experimental), impermeabilização com uma solução de dióxido de silício. Um espécime de cada grupo teve a superfície observada em microscopia eletrônica de varredura, e dois espécimes de cada grupo, aleatoriamente selecionados, tiveram análise do ângulo de contato para verificar a hidrofobicidade do material. Num segundo momento, foram confeccionados dispositivos palatinos de resina acrílica para 20 voluntários, contendo 6 amostras, 3 de cada grupo (N=60), para uso durante 2 dias. Após esse período foi quantificado o biofilme formado através de ensaios avaliando a atividade metabólica mitocondrial pela redução do sal tetrazólio (XTT), e biomassa total através de ensaio com cristal violeta (CV). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Barlett e modelo Gamma com efeito aleatório para a variável resposta. A atividade metabólica produzida pelos microrganismos no biofilme sobre os blocos tratados com o dióxido de silício foi significativamente menor que aquela produzida sobre os blocos controle ( $p=0,02$ ). Com relação a quantidade de matriz extracelular produzida pelos microrganismos (pelo método do CV) não houve diferença entre o GCT e o GVL. Conclui-se que a aplicação de uma camada de revestimento a base de dióxido de silício sobre a resina acrílica termicamente ativada reduziu a atividade do biofilme polimicrobiano formado *in situ*. Este procedimento pode ser vantajoso em pacientes portadores de próteses totais convencionais ou protocolos sobre implantes confeccionados em resina acrílica e que apresentam dificuldade motora para realizar a higienização das mesmas.

Palavras-chave: microrganismos, resina acrílica, adesão celular

## **ABSTRACT**

The presence of biofilm on the acrylic resin dental prostheses may cause, over time, bad breath and gingival inflammation. A surface that hinders microbial adherence can have a beneficial effect. The objective of this study was to evaluate the influence of the silicon dioxide applied on the acrylic resin in the adhesion of microorganisms. One hundred and twenty blocks (5X5mm) of thermally activated acrylic resin were made. Initially, the blocks were evaluated for surface roughness, using the profilometer. All specimens were then randomly divided into 2 groups: GCT (control) and GVL (experimental), waterproofing with silicon dioxide (LiquidGlass Shield, TOPTEK Equip. Ltda). One specimen from each group had the surface observed in scanning electron microscopy, and two specimens from each group, randomly selected, had contact angle analysis to verify the hydrophobicity of the material. Secondly, acrylic resin palatine devices containing 6 samples, 3 of each group (N = 60) were made and 20 volunteers used them for 2 days. After this period, the biofilm formed by assaying the metabolic activity with reduction of phenylamino and XTT, and total biomass through the crystal violet (CV) assay, were quantified. The results were submitted to the Barlett normality test and Gamma model with random effect for the response variable. The metabolic activity produced by the microorganisms (XTT) in the biofilm on the blocks treated with the bioglass was significantly lower than that produced on the control blocks ( $p = 0.02$ ). Regarding the amount of extracellular matrix produced by the microorganisms (by the CV method) there was no difference between the GCT and the GVL, since the "p" value was at the border of the level of significance ( $p = 0.05$ ). It was concluded that the application of a coating layer based on silicon dioxide on the thermally activated acrylic resin reduced the activity of the polymicrobial biofilm formed in situ. This procedure may be advantageous in patients with conventional full dentures or protocols on implants made of acrylic resin and which present motor difficulties to carry out the hygiene of the prosthesis.

Key words: microorganisms, acrylic resin, cell adhesion

## 1 INTRODUÇÃO

No último levantamento feito em 2010 pela Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (SB Brasil 2010), apesar da expressiva diminuição do índice de cárie em diversas faixas etárias e do aumento do acesso aos serviços de saúde, a população continua a perder seus dentes ao longo da vida<sup>1</sup>. Em contrapartida, estima-se que dentre adultos a necessidade de prótese acontece em 68,8% dos casos. Entre os idosos de 65 a 74 anos, apenas 23,5% não utilizavam próteses superiores. Trabalhos realizados na Europa concluíram que Finlândia, Grécia, Turquia e Bulgária têm aproximadamente um terço de seus idosos edêntulos. Diversos outros países desse continente têm aproximadamente 20% de sua população enfrentando o mesmo problema.<sup>15</sup>

A resina acrílica é amplamente utilizada na Odontologia<sup>2,3</sup> na fabricação de próteses desde 1937, por algumas de suas características, dentre as quais se destacam baixo custo, facilidade de manipulação e capacidade de combinação de cores<sup>2,3</sup>. Porém, com o passar do tempo, esse material retém pigmentos e microorganismos organizados em biofilme capazes de provocar mau hálito e inflamação gengival e ainda não foi descoberto um método eficaz capaz para reduzir a aderência microbiana e de pigmentos retidos nas porosidades superficiais da resina acrílica<sup>3,4</sup>. Vários métodos de limpeza têm sido utilizados para a desinfecção<sup>5,6,7</sup> ou alteração estrutural, criando-se resinas com propriedades antimicrobianas<sup>8,9,10</sup>. Apesar de auxiliarem na diminuição de biofilme microbiano das superfícies, os métodos podem alterar negativamente as propriedades físicas e mecânicas da resina<sup>7</sup>, influenciando sua estética e durabilidade. Além disso, exige-se um certo grau de coordenação motora e destreza manual para que a limpeza seja eficaz. Pacientes idosos frequentemente perdem essa capacidade motora exigida para realizar o procedimento<sup>6</sup>. Ademais, os agentes são liberados com o passar do tempo, reduzindo a sua eficácia<sup>9,10</sup>.

Uma superfície impermeável e lisa é de grande importância na prevenção da retenção de biofilme<sup>11</sup>. O dióxido de silício em escala nanométrica tem sido utilizado em ambientes hospitalares<sup>12</sup>. Seu revestimento resulta em uma superfície com



quantidade de microorganismos maciçamente reduzida e fácil de limpar. Atualmente, é possível encontrá-lo na forma de spray, podendo assim ser utilizado facilmente em clínicas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in situ* o uso do dióxido de silício como uma camada de revestimento da resina acrílica, a fim de testar a sua eficácia como agente redutor da retenção de biofilme polimicrobiano.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Inicialmente o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética Local (CAAE: 86984317.9.0000.0104) e aprovado sob o parecer 2.698.664 (ANEXO 1).

### **2.1 Preparação dos corpos de prova**

Foram produzidos 120 corpos de prova, de resina acrílica termopolimerizável (VipiCril Plus, VIPI Indústria - Pirassununga, SP, Brasil), nas dimensões 5mm x 5mm. Para isso, o líquido acrílico termopolimerizável (PALATON, Dencril produtos odontológicos, Pirassununga, SP, Brasil) juntamente com a resina acrílica (VipiCril Plus, VIPI Indústria - Pirassununga, SP, Brasil), foram misturados em um recipiente, respeitando as proporções indicadas pelo fabricante (6,5ml de líquido para cada 14g de pó). Após entrar na fase plástica, o material foi prensado e colocado em uma polimerizadora termo pneumática a uma temperatura de 80°C e 100 libras de pressão por 10 minutos. O acabamento inicial foi feito com brocas e fresas, deixando os corpos de prova com dimensões padronizadas.

### **2.2 Rugosidade superficial**

Considerando a necessidade de uma padronização da rugosidade superficial dos espécimes, os blocos de resina acrílica foram levados à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, onde foram submetidos ao polimento sequencial, inicialmente com discos de carbeto de silício de granulação #320, 400 e 600 em uma politriz (Aropol -2V, Arotec S.A. Ind. e Com., Cotia, SP, Brasil) durante 15 segundos e na sequência, com feltros (TOP, RAM and ABOVE-Arotec), e pastas diamantadas (6 µm, 3 µm-RAM, 1 µm- SUPRA-Arotec). Entre cada etapa e após final do polimento,

as amostras foram lavadas durante 2 minutos, com água destilada em um banho ultrassônico (Biowash STD-Bioart, São Paulo, Brasil) para remover possíveis detritos da superfície.

A rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) dos espécimes foi então mensurada utilizando-se um perfilômetro (Surfcorder SE 1700; Kosaka Laboratory Ltd., Kosaka, Japan), com precisão de 0,01mm, calibrado com o comprimento de amostra de 0,8 mm, percussão de 2,4 mm e 0,5 mm / s (Figura 1). Três leituras foram realizadas em cada espécime e o valor da média foi obtido.



*Figura 1. Imagem da análise de rugosidade superficial dos blocos de resina em um perfilômetro.*

A figura 2 apresenta o fluxograma do experimento

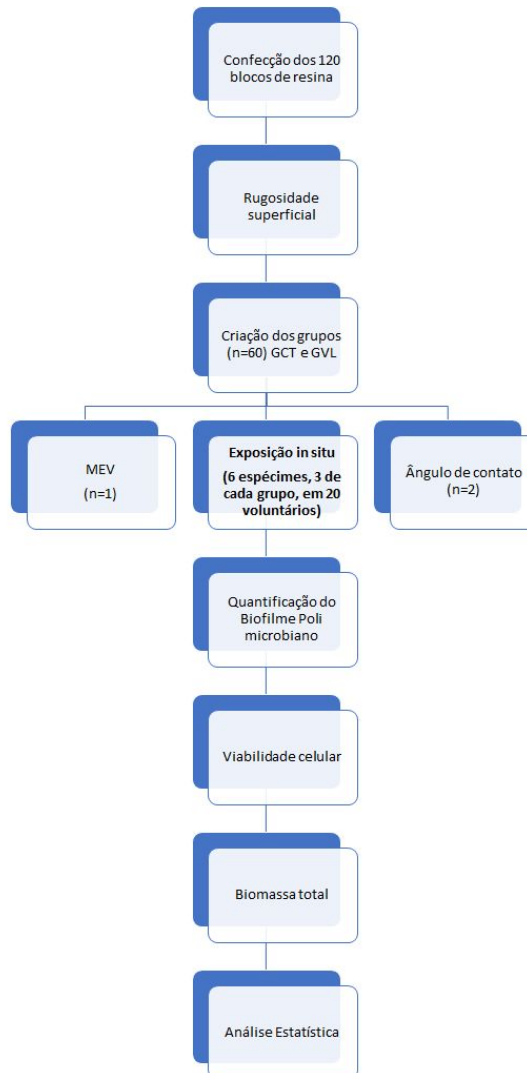


Figura 2 - Fluxograma do experimento

### 2.3 Preparação das amostras e espécimes

Os espécimes foram separados aleatoriamente em dois grupos (N=60: GCT (controle), resina acrílica; GVL (experimental), impermeabilizado com Dióxido de silício LiquidGlass Shield (TOPTEK Equipamentos Ltda, Belo Horizonte, Mg, Brasil). O revestimento dos espécimes com o dióxido de silício foi realizado conforme as instruções do fabricante. Inicialmente o frasco foi agitado, pulverizado sobre uma gaze estéril que auxiliou na aplicação do produto na superfície da resina. Os blocos foram armazenados por 24 horas a fim de aguardar o tempo de cura.

## 2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar as características da superfície dos espécimes com ou sem a aplicação do dióxido de silício, um espécime de cada grupo foi fixado em um suporte, revestido com ouro em atmosfera de argônio (Figura 3), usando um módulo de ouro em um evaporador a vácuo. As amostras foram observadas com em um microscópio eletrônico de varredura Quanta 250™ SEM (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, U.S) com uma ampliação de 1000×. Os testes foram realizados no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá.



Figura 3. Imagem dos blocos de resina revestidos com ouro.

## 2.5 Ângulo de contato

Dois espécimes de cada grupo, aleatoriamente selecionados, tiveram suas superfícies avaliadas de acordo com o grau de hidrofobicidade, na Universidade do Minho, Braga, Portugal.

O grau de hidrofobicidade ( $\Delta G_{\text{sws}}$ ) e a energia superficial foram avaliados utilizando a abordagem de van Oss et al (1988). onde gotas de um líquido padronizado (água, glicerol e bromonaftaleno) são colocadas sobre a superfície da resina.

A gota gera uma tensão superficial sobre a resina, e isso resulta em uma angulação variável da própria gota, de acordo com a hidrofobicidade da superfície. A angulação média de cada líquido foi analisada, e a energia da superfície foi calculada.

A medição desse ângulo foi realizada com um tensiômetro óptico (model OCA 15 PLUS, DATAPHYSICS) equipado com um software de análise de imagem (Attension Theta).

O ângulos de contato com a água foi utilizado como indicação qualitativo da hidrofobicidade da superfície, com ângulo menor que 65 °, indicando uma superfície

mais hidrofílica<sup>24</sup>. Cada ensaio foi realizado em triplicata e pelo menos 20 ângulos de contato, por amostra, foram medidos.

## **2.6 Exposição in situ**

Para a etapa do estudo *in situ*, 20 voluntários foram selecionados seguindo os critérios de inclusão: fluxo salivar normal, ausência de cáries e/ou doença periodontal. Foram excluídos os pacientes fumantes, utilizando dispositivos ortodônticos, prótese fixa ou removível.

A arcada superior dos voluntários foi moldada com alginato (Jeltrate Dustless, Dentsply – Rio de Janeiro, Brasil) e os modelos em gesso foram confeccionados em gesso especial (Durone IV, Dentsply Indústria e Comércio. Petrópolis – RJ – Brasil). Sobre os modelos de gesso isolados (Cel-Lac, SS White Artigos Dentários Ltda) foram colados seis cubos de silicona de adição pesada (Elite HD+, Zhermack Dental, Roma, Itália) nas dimensões de 5mm x 5mm x 3 mm com cola à base de cianoacrilato (Super bonder: Loctite, Henkel Ltda, São Paulo, Brasil) a fim de formar espaços para a posterior inserção dos espécimes, que deveriam ficar voltados para a cavidade oral. O conjunto modelo + blocos de silicona foram novamente isolados para a confecção dos dispositivos intraorais palatinos (Figura 4) em resina acrílica autopolimerizável (JET – Clássico Artigos Odontológicos Ltda., Campo Limpo Paulista, SP, Brasil).

Os voluntários foram instruídos a utilizar o dispositivo durante todo o dia, retirando durante as refeições, ingestão de líquidos (exceto água) e higienização. Durante esses períodos, os dispositivos foram armazenados em recipiente com gaze embebida em água destilada. Os voluntários foram orientados a não submetê-los à soluções contendo flúor, sendo que a higienização do dispositivo deveria ser feita apenas na sua porção interna. Na manhã do 2º dia os dispositivos foram entregues aos pesquisadores para a remoção dos espécimes e quantificação de biofilme.



Figura 4. Imagem do dispositivo palatino, com espaços destinados aos blocos de resina.

## 2.7 Quantificação do Biofilme Polimicrobiano

Após a remoção dos dispositivos, 3 de cada paciente, os espécimes foram retirados e o biofilme formado foi quantificado pelos métodos clássicos de avaliar a viabilidade celular (Pierce et al,) e biomassa total (O'Toole em 2011) do biofilme formado sobre as superfícies testadas, sendo realizado no laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

## 2.8 Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular (quantificação e células viáveis no biofilme) foi realizado utilizando o reagente 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5- sulfofenil) -5- (fenilamino) -carbonil-2H-tetrazolium-hidróxido (XTT; Sigma-Aldrich, EUA). Cada espécime foi retirado do dispositivo palatino e colocado individualmente em um poço de uma placa de 96 poços. Um volume de 200  $\mu$ l de solução final de XTT foram adicionados a cada poço e incubados por 3 h a 37 °C sob agitação a 110 rpm. A solução final XTT foi preparada com 10  $\mu$ g /  $\mu$ l de Metosulfato de Fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich, EUA). Depois, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384, EUA) a 490 nm. Os valores de absorbância foram padronizados por unidade de área do poço (absorbância /  $\text{cm}^2$ ) (Figura 5a). Como controle negativo foi utilizado um espécime que não entrou em contato com o paciente. Os valores de absorbância dos poços de controles negativos foram subtraídos dos valores dos poços de teste para considerar qualquer absorbância de fundo<sup>14</sup>.

## 2.9 Biomassa total

Para avaliar a biomassa total (matriz extracelular e número de células), os mesmos espécimes que passaram pela redução de XTT, foram relocados para uma nova placa de 96 poços, onde foram fixados com 200 µl de metanol a 100% (v / v), durante 15 minutos. Os espécimes foram corados com uma solução de violeta de cristal a 0,1% v / v (CV; Sigma-Aldrich, EUA) por 5 min. Posteriormente, os espécimes foram lavados duas vezes com água estéril Milli-Q e descorados com ácido acético (33% v / v). Por fim, 100 µl da solução de descoloração de cada amostra foram transferidos para uma nova placa e medidos com um leitor de placa de espectrofotômetro (leitor de microplacas SpectraMax Plus 384, EUA) a 620 nm (Figura 5b). Foram utilizados espécimes que não entraram em contato com pacientes como controle negativo. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos dos valores dos poços de teste para minimizar a interferência de fundo. A coloração CV foi utilizada para avaliar a quantificação da biomassa total, composta por leveduras e componentes da matriz, e os valores finais de absorbância foram padronizados de acordo com a área (absorbância / cm<sup>2</sup>)<sup>13</sup>.

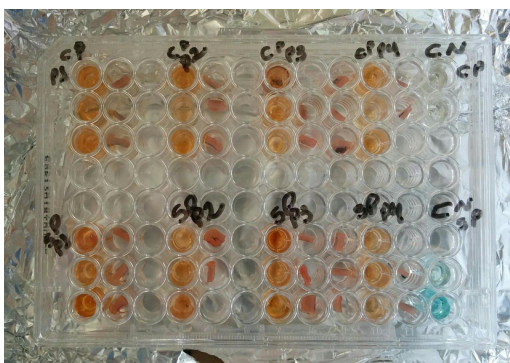


Figura 5a

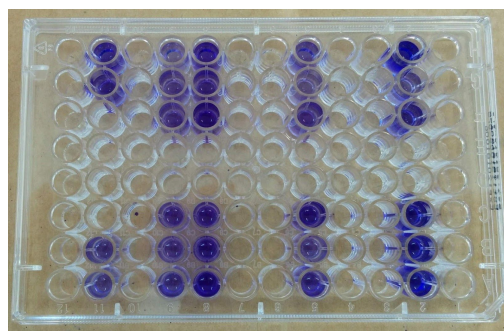


Figura 5b

Figura 5 - Imagem da placa de 96 poços após preparo com XTT (figura 5a), e a placa de 96 poços após preparo com CV (figura 5b).

### **3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para o cálculo do tamanho amostral utilizou-se dados preliminares da amostra piloto. Adotou-se a distância de Cohen para avaliar o tamanho do efeito. Como consequência, obteve-se para um poder de teste 85%, um  $n = 19$ , considerando nível de significância de 5% e tamanho do efeito 0.73.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Barlett e, não apresentaram distribuição normal. O fato de cada indivíduo receber 3 réplicas de blocos na boca, sugere que há uma variabilidade inerente a cada paciente que possivelmente interfere na variável resposta. Para acomodar estas características, adotou-se a metodologia de modelos generalizados mistos, e uma vez que os dados apresentam uma assimetria positiva, adotou-se um modelo Gamma misto. Isso significa dizer, que foi considerado a variabilidade dos tratamentos como efeitos fixos e a variabilidade inerente ou latente de cada indivíduo como efeito aleatório. Estabeleceu-se um nível de significância de 5%. As análises foram executadas no software R i386 3.0.2.

### **4 RESULTADOS**

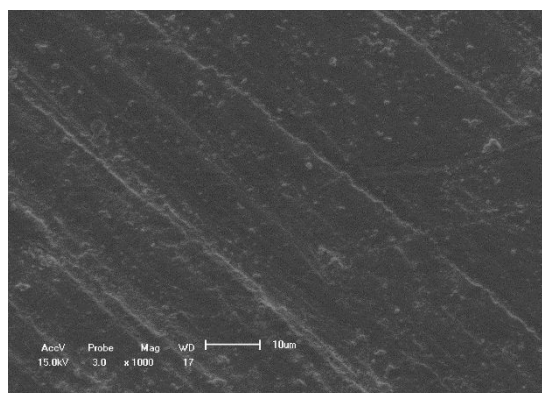
Os valores da rugosidade superficial dos espécimes ( $0,47 \pm 0,06\mu\text{m}$ ) apresentaram-se conforme sugerido na literatura por Lima et al. (2006).

As fotomicrografias obtidas pelo MEV da superfície da resina acrílica no grupo controle (GCT e tratado com o vidro líquido (GVL) são apresentadas na figura 6.

Apesar da superfície da resina acrílica na figura 6b ter recebido a aplicação do vidro líquido, isso não foi perceptível no MEV uma vez que o dióxido de silício forma uma cobertura homogênea, de aproximadamente 100nm.



6a – GCT



6b – GVL

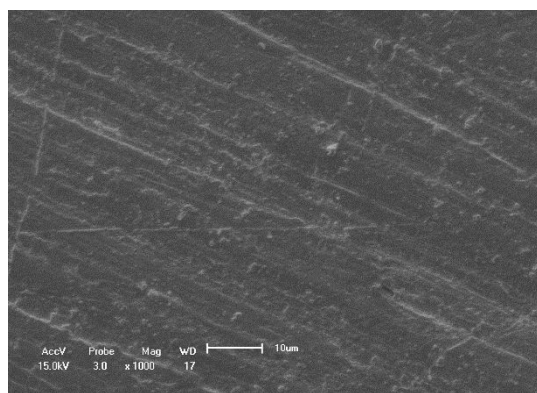


Figura 6 - Imagem feita pelo microscópio eletrônico de varredura da superfície dos blocos de resina acrílica controle (GCT) e tratados com o dióxido de silício (GVL). (magnificação 1000×).

Os valores calculados para a avaliação do ângulo de contato formado entre uma gota de líquido e a superfície dos blocos de resina acrílica nos 2 grupos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Ângulo de contato com a água ( $\theta$ ), parâmetros de tensão superficial ( $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ ) e grau de hidrofobicidade ( $\Delta G_{\text{sWS}}$ ) dos blocos de resina acrílica no grupo controle (GCT) e tratado com dióxido de silício (GVL). Os valores estão representados pelas médias  $\pm$  desvios-padrão de três experimentos independentes para cada condição.

Grupos	Parâmetros de superfície			
	$\theta$ (°)	$\gamma^+$ (mJm <sup>-2</sup> )	$\gamma^-$ (mJm <sup>-2</sup> )	$\Delta G_{\text{sWS}}$ (mJm <sup>-2</sup> )
GCT	104,1± 2,8	12,0	14,4	-9,5
GVL	114,3± 4,4	2,1	1,6	-54,4

O cálculo de hidrofobicidade apresentou  $\Delta G_{\text{sws}}$  Total de -9,5 no grupo controle (GCT), e se mostrou menor (-54,4) no grupo com dióxido de silício (GVL), demonstrando assim, mais hidrofóbico o grupo GVL. Em relação a capacidade de doar e receber elétrons ( $\gamma^-$  (mJm<sup>-2</sup>) e  $\gamma^+$  (mJm<sup>-2</sup>) houve mudança na polaridade, em que o grupo controle (GCT) havia menor  $\gamma^+$  (12,0) e maior  $\gamma^-$  (14,4) e o grupo tratado (GVL) apresentou maior  $\gamma^+$  (2,1) e menor  $\gamma^-$  (1,6), alterando assim a superfície de polar para apolar.

Os resultados da análise da atividade metabólica do biofilme (XTT) e da análise com Cristal Violeta da matriz extracelular produzida pelos microrganismos para os grupos controle (GCT) e tratado com dióxido de silício (GVL) são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da atividade metabólica e biomassa total dos biofilmes dos grupos controle (GCT) e experimental (GVL).

Teste	Grupo	Média	Desvio padrão	p-valor
Atividade metabólica	GCT	0,44	±0,44	0,02
	GVL	0,34	±0,38	
Biomassa total	GCT	0,73	±0,44	0,05
	GVL	0,79	±0,45	

p-valor: considerado significância  $P < 0,05$

A atividade metabólica produzida pelos microrganismos no biofilme sobre os blocos tratados com o dióxido de silício foi significativamente menor que aquela produzida sobre os blocos controle ( $p=0,02$ ). Entretanto em relação a biomassa total não houve diferença significativa ( $p=0,05$ )

## 5 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho avaliando o efeito do dióxido de silício como camada de revestimento de superfícies de resina acrílica na adesão de biofilme, em um estudo *in situ*. Os resultados demonstraram que os blocos de resina acrílica revestidos com dióxido de silício apresentaram-se com menor energia livre (GCT vs GVL, -9,5 vs -54,4) e maior ângulo de contato (GCT vs GVL, 104,05° vs 114,274°). Os resultados da análise da atividade metabólica do biofilme (XTT) apresentaram diferenças estatisticamente significantes, porém a análise da matriz

extracelular (CV) não apresentou diferenças significativas entre os grupos GVL e GCT.

A metodologia estatística adotada foi um modelo Gamma, uma vez que os dados não seguem uma distribuição Normal. E além disso, como cada paciente recebeu três placas na boca, é intuitivo supor que há uma correlação inerente entre elas. Para acomodar esta característica, adotou-se um modelo Gamma com efeitos aleatórios no indivíduo.

Estudos prévios<sup>18</sup> indicam a necessidade da padronização da rugosidade das superfícies, com médias maiores que 0,2  $\mu\text{m}$ , a fim de permitir a avaliação do acúmulo de microorganismos. As superfícies analisadas nesse estudo apresentaram média de 0,47 $\mu\text{m}$ . Esse dado é de extrema importância, pois demonstra a padronização das superfícies, possibilitando assim a adesão de microorganismos de forma uniforme, reduzindo as variáveis que poderiam afetar os resultados do estudo.

A topografia de superfície, analisada pelo MEV, foi semelhante nos dois grupos, mesmo com aumentos de 1000x. O dióxido de silício forma uma camada fina e homogênea em toda a superfície, sem modificar as características visuais da resina acrílica, o que representa uma grande vantagem do produto aplicado..

A metodologia de Van Oss<sup>17</sup> foi empregada nesta pesquisa, com a finalidade de avaliar o ângulo de contato, ou ângulo de umectância de cada superfície e, como consequência, apresentar resultados que permitissem a análise da molhabilidade de cada superfície. Nessa metodologia, gotas de diferentes líquidos, previamente padronizados, foram inseridas nas superfícies analisadas. A média de cada líquido foi calculada e, com base nessas informações, a energia superficial foi definida. Pode-se dizer que em ambos os grupos as superfícies demonstraram-se hidrofóbicas quando foram analisadas as gotas de água e glicerol, que se situam entre  $90^\circ < \theta < 180^\circ$ . Na gota de bromonaftaleno, as superfícies apresentaram maior molhabilidade com angulação média de 48,3°, no grupo GCT, e de 64,65° no grupo GVL.

A superfície com menor ângulo de contato apresenta maior energia livre, sendo mais hidrofóbica. Em superfícies com alta energia livre, o líquido interage com a mesma por meio de ligações químicas, ao passo que em superfícies com baixa energia livre os substratos se ligam por meio de forças. As ligações químicas são mais fortes do que as forças, isso faz com que maior energia livre seja mais hidrofóbica do que baixa energia livre.<sup>19</sup> Nas superfícies com alta energia de contato, o líquido se espalha mais, criando um ângulo de contato menor. O cálculo de energia livre apresentou o grupo GVL com menor energia livre ( $\Delta G_{|w|} = -54,4$ ) do que o grupo GCT ( $\Delta G_{|w|} = -9,5$ ). Esses resultados são de extrema importância, pois possibilitam constatar que o dióxido de silício está na superfície e causa alterações na mesma, uma vez que essas alterações não foram perceptíveis nas fotomicrografias, e indicam que as superfícies tratadas com o produto se

apresentaram mais hidrofóbicas do que o grupo controle, o que pode desfavorecer a adesão microbiana. Quanto a mudança de polaridade, que é relação da capacidade de doar e receber elétrons ( $\gamma$  (mJm<sup>-2</sup>) e  $\gamma^+$  (mJm<sup>-2</sup>)) da superfície, os resultados apresentados nesse estudo tem relação direta com a baixa formação de biofilme na superfície. A adesão de microorganismos pode ser considerada a primeira etapa para a formação de biofilmes em superfícies abióticas, e a mudança de energia livre, que alterou a polaridade da superfície avaliada, tornando-a repulsiva, pode ter resultados diretos na formação do biofilme polimicrobiano.

A resina tratada com dióxido de silício nos experimentos *in situ* apresentou significativamente menor atividade celular, ou seja menos número de microrganismos aderidos, em relação ao grupo controle (não tratado). Pois o princípio da técnica de redução do XTT está na capacidade de células ativas em metabolizar o sal tetrazólio, tornando-os compostos coloridos, indicando a viabilidade do metabolismo do biofilme microbiano<sup>22, 23</sup>. Já para a análise de biomassa total com corante cristal violeta o grupo GCT apresentou uma média levemente menor que o grupo GVL, mas sem diferença estatisticamente significativa, ou seja, não houve diferença de biomassa total entre os materiais (tratado e não tratado). O método de CV é amplamente utilizado para detecção de biomassa total de biofilmes mono e polimicrobianos, quantificando todas as estruturas que compõem o biofilme (matriz polissacarídica e microrganismos). Nesse sentido, pode-se inferir que a superfície tratada há um menor número de microrganismos aderidos (pela técnica do XTT), porém a mesma quantidade de biomassa total, especificamente a matriz extracelular (pela técnica do CV). É importante ressaltar que ambos os testes utilizados nesta pesquisa são amplamente empregados para avaliar diferentes biofilmes microbianos<sup>24, 25</sup>, entretanto um viés que deve ser citado na técnica de CV, isoladamente, é a incapacidade de definir a massa de biofilme de células mortas ou vivas, visto que o cristal violeta é capaz de corar ambas<sup>20, 21</sup>. Por isso, seus resultados devem ser correlacionáveis com o XTT. Além disso, não foi possível especificar quais os microorganismos estavam presentes no biofilme e nem sua estrutura.

Pode-se notar que as limitações das técnicas foram minimizadas com as correlações entre os métodos que se complementam e nos permitiram fazer uma análise crítica e eficaz sobre os grupos analisados. Apesar de estudos *in situ* apresentarem maior quantidade de variáveis, nesta pesquisa foi possível reduzi-las com a seleção criteriosa de voluntários, a padronização das resinas, com a análise realizada em triplicata e o modelo estatístico Gamma, que foi adotado para acomodar as características aleatórias, inerentes a um estudo realizado com voluntários.

A. F. Wady et al<sup>27</sup>, utilizaram um ensaio com XTT para avaliar a adesão *Candida albicans* e a formação de biofilme em dentaduras feitas com resina acrílica incorporada com nanopartículas de prata. Nesse estudo, *in vitro*, foi avaliada a hidrofobicidade da superfície com a técnica do ângulo de contato, e a formação e

aderência dos microorganismos pelo ensaio de xtt. Os pesquisadores conseguiram notar uma redução na hidrofobicidade e nenhum efeito na formação fúngica e microbiana.

Foi possível observar que as resinas acrílicas revestidas com dióxido de silício apresentaram vantagens significativas sobre as resinas com superfície convencional, em relação a atividade do biofilme polimicrobiano presente sobre elas. Esses resultados podem ter implicações de grande importância clínica, uma vez que o dióxido de silício apresenta baixo custo e fácil aplicação. O presente estudo, com base em 20 voluntários, é apenas um primeiro passo para avaliar as diferenças clínicas possíveis em pacientes que utilizam próteses convencionais e as resinas propostas nesse trabalho, mas é um estudo de importância, considerando o potencial clínico de suas aplicações.

Estudos futuros são recomendados para avaliar a duração do revestimento de dióxido de silício na superfície de resina acrílica, e sua resistência a escovação, apresentando dessa forma um tempo médio para reaplicação do produto.

## **6 CONCLUSÕES**

A aplicação de uma camada de revestimento a base de dióxido de silício sobre a resina acrílica termicamente ativada mostrou reduzir a atividade do biofilme polimicrobiano formado *in situ*. Este procedimento pode ser vantajoso em pacientes portadores de próteses totais convencionais ou protocolos sobre implantes confeccionados em resina acrílica e que apresentam dificuldade motora para realizar a higienização das mesmas.

## REFERÊNCIAS

- 1) Ministério da Saúde. SB BRAZIL 2010: National Research on Oral Health: main results. Brasília; 2012. Available from: [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)
- 2) Straieto FG, Ricomini Filho AP, Fernandes Neto AJ, Del Bel Cury AA. Polytetrafluorethylene added to acrylic resins: mechanical properties. *Braz Dent J* [Internet]. 2010 Jan [cited 2017 Sep 8];21(1):55–9.
- 3) Anne G, Bindu Oliganti S, Atla J, Budati S, Manne P, Chiramana S. The effect of aluminum oxide addition on the flexural strength of heat activated acrylic resin: An in vitro study. *J Dr NTR Univ Heal Sci* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):21–3.
- 4) Cunha TR, Regis RR, Bonatti MR, Souza RF de. Influence of incorporation of fluoroalkyl methacrylates on roughness and flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Sep 8];17(2):103–7.
- 5) Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, de Souza RF, da Silva CHL, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2010 Apr [cited 2017 Sep 8];54(2):78–83.
- 6) Pinto TMS, Neves ACC, Leão MVP, Jorge AOC. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Sep 8];16(6):385–90.
- 7) Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, et al. Eradication of a Mature Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. *Braz Dent J* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Sep 8];24(5):487–91.
- 8) Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent* [Internet]. 2001 Apr [cited 2017 Sep 8];85(4):352–6.
- 10) Casemiro LA, Martins CHG, Pires-de-Souza F de CP, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology* [Internet]. 2008 Sep [cited 2017 Sep 8];25(3):187–94.
- 11) Santos RL dos, Pithon MM, Carvalho FG, Ramos AA dos S, Romanos MTV, Santos RL dos, et al. Mechanical and Biological Properties of Acrylic Resins

Manipulated and Polished by Different Methods. *Braz Dent J* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Sep 8];24(5):492–7.

12) Mogensen JE, Jørgensen P-E, Thomsen TR. A microbiological evaluation of SiO<sub>2</sub>-coated textiles in hospital interiors: The effect of passive coatings on the cleaning potential of interior textiles. *J Ind Text* [Internet]. 2016;46(2):361–71.

13) O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Visualized Exp.* 30, pii: 2437.

14) Pierce, C.G., Uppuluri, P., Tummala, S., Lopez-Ribot, J.L., 2010. A 96 well microtiter plate based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J. Visualized Exp.* 21, pii: 2287.

15) Carvalho, J. C., & Schiffner, U. (2018). Dental Caries in European Adults and Senior Citizens 1996-2016: ORCA Saturday Afternoon Symposium in Greifswald, Germany - Part II. *Caries Research*, 53(3), 242–252.

16) Lima EMCX, Moura JS, Cury AADELBEL, Garcia RCMR. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. 2006;(5):356–62.

17) Van Oss, C. J., Good, R., Chaudhury, M., 1988. Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles, *Langmuir* 4, 884-891.

18) Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997;13:258–269.

19) de Gennes, P. G. (1985). Wetting: statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), 827–863. <http://doi.org/10.1103/RevModPhys.57.827>

20) STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. v.115, n.8, p.891-899, 2007.

21) PANTANELLA, F. et al. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*.v.25, n.1, p.31-42, 2013.

- 22) KOBAN, I. et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushygiene/Interdisziplinär.*, v.7, n.1, p.1-10, 2012.
- 23) PIERCE, C.G. et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, v.3, n.9, p.1494–1500, 2008.
- 24) Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interfac* 1998; 74: 69-117.
- 25) Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, Camargo ER de, Oliveira R, et al. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*. 2012 May 1;54(5):383–91.
- 26) Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*. 2012 Jun 1;112(6):1163–72.



## **ANEXOS**

ANEXO 1 (aprovação do COPEP, na última página)

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada “Avaliação da adesão de biofilme em superfícies de resina acrílica revestidas por dióxido de silício - estudo *in situ*”, que faz parte do curso de Odontologia e é orientada pela prof Dr<sup>a</sup> Renata Corrêa Pascotto da Universidade Estadual de Maringá. O objetivo deste estudo será avaliar a influência do uso do dióxido de silício aplicado sobre a resina acrílica, na adesão de *microorganismos*. Para isto a sua participação é muito importante, e ela se daria da seguinte forma: pequenos blocos de resina acrílica serão esterilizados e acoplados a dispositivos intra-orais. Esses dispositivos devem ser usados pelos voluntários. Dessa forma poderemos quantificar a quantidade de microrganismos aderidos na superfície da resina acrílica. Os dispositivos intra orais deverão ser utilizados durante todo o dia, devendo ser retirados durante as refeições e higienização. Durante estes períodos, os dispositivos deverão ser armazenados em recipiente com algodão umedecido com água deionizada, que será fornecida pelos pesquisadores. Você não deve submeter o dispositivo a soluções contendo flúor (como é o caso de alguns enxaguatórios bucais), nem escovar o dispositivo e os

blocos dentários com escova de dente e creme dental. Os dispositivos deverão ser higienizados somente com água corrente. Informamos que poderá ocorrer algum desconforto durante a utilização do dispositivo. Nesse caso, contate os membros participantes deste estudo para checar a adaptação e possíveis ajustes que tenham que ser realizados. Poderá ocorrer, também, a alteração da pronúncia de alguns fonemas em virtude do volume palatino dos dispositivos. Assim que são retirados da cavidade bucal, essa alteração desaparece. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Este estudo não trará benefícios diretos aos voluntários. A partir dos dados do presente trabalho, porém, será possível avaliar a capacidade de adesão de microrganismos em superfícies revestidas com dióxido de silício. Isso permitirá estabelecer uma nova técnica que permita aos pacientes uma forma mais efetiva de higienização de próteses confeccionadas em resina acrílica, uma vez que espera-se que o produto tenha uma ação impermeabilizadora. Caso você tenha mais dúvidas ou necessite maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta deste documento. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Eu,.....(nome por extenso do sujeito de pesquisa) declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE da pesquisa coordenada pelo Prof.....(nome do pesquisador responsável).

\_\_\_\_\_ Data:.....

Assinatura ou impressão datiloscópica

Eu,.....(nome do pesquisador ou do membro da equipe que aplicou o TCLE), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa supra-nominado.

\_\_\_\_\_ Data:.....

Assinatura do pesquisador

Página 2 de 3

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, conforme o endereço abaixo:

Nome: Renata Corrêa Pascotto

Endereço: Av. Mandacarú, 1550

(telefone/e-mail):3011-9051/ renatapascotto@gmail.com

Qualquer dúvida com relação aos aspectos éticos da pesquisa poderá ser esclarecida com o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa (COPEP) envolvendo Seres Humanos da UEM, no endereço abaixo:

COPEP/UEM

Universidade Estadual de Maringá.

Av. Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.

Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.

CEP 87020-900. Maringá-Pr. Tel: (44) 3261-4444

E-mail: copep@uem.br

Página 3 de 3

## ANEXO 3

### ORIENTAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Você está participando do estudo “Avaliação da formação de biofilme em superfícies de resina acrílica revestidas por dióxido de silício - estudo in situ”. Durante o período experimental, você deverá:

- Utilizar o dispositivo continuamente (durante todo o dia), exceto durante as refeições (que devem totalizar no máximo 3 horas diárias);
- Durante a alimentação, os dispositivos deverão ser armazenados em recipiente com algodão umedecido com água deionizada, fornecida pelos pesquisadores;
- Você não deve submeter o dispositivo a soluções contendo flúor (como é o caso de alguns enxaguatórios bucais), nem escovar o dispositivo e os blocos dentários com escova de dente e creme dental;

- A higiene dental deverá ser realizada normalmente após as refeições (café da manhã, almoço e jantar), utilizando dentifrício, fio dental e escova dental;
- Os dispositivos deverão ser higienizados somente com água corrente;
- Não ingerir bebidas fora do horário das refeições (enquanto estiver com o dispositivo), exceto água;
- Não ingerir medicamentos durante o período experimental;
- Se ocorrer algum desconforto durante a utilização do dispositivo, contacte os membros participantes deste estudo.

Em caso de dúvida, ligar: Rossano – telefones: (44) 99973-0885