AMÁLIA MORENO

AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. EM RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR E ALTERAÇÃO DE COR DE BOTÕES DE ÍRIS ARTIFICIAIS, VARIANDO A COR E AS TÉCNICAS DE OBTENÇÃO, AMBOS APÓS DESINFECÇÃO QUÍMICA

Araçatuba

2014

AMÁLIA MORENO

AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. EM RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR E ALTERAÇÃO DE COR DE BOTÕES DE ÍRIS ARTIFICIAIS, VARIANDO A COR E AS TÉCNICAS DE OBTENÇÃO, AMBOS APÓS DESINFECÇÃO QUÍMICA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Prótese Dentária.

Orientador Prof. Adj. Marcelo Coelho Goiato

Coorientadora Profª. Ass. Drª. Daniela Micheline dos Santos

Araçatuba

2014

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Moreno, Amália.

M843a Avaliação da adesão de Staphylococcus spp. em resina acrílica específica para prótese ocular e alteração de cor de botões de íris artificiais, variando a cor e as técnicas de obtenção, ambos após desinfecção química / Amália Moreno. - Araçatuba, 2014

186 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Marcelo Coelho Goiato

Coorientadora: Profa. Daniela Micheline dos Santos

1. Desinfecção 2. Olho artificial 3. Cor 4. Resinas acrílicas 5. Prótese maxilofacial 6. Biofilmes I. T.

Black D3

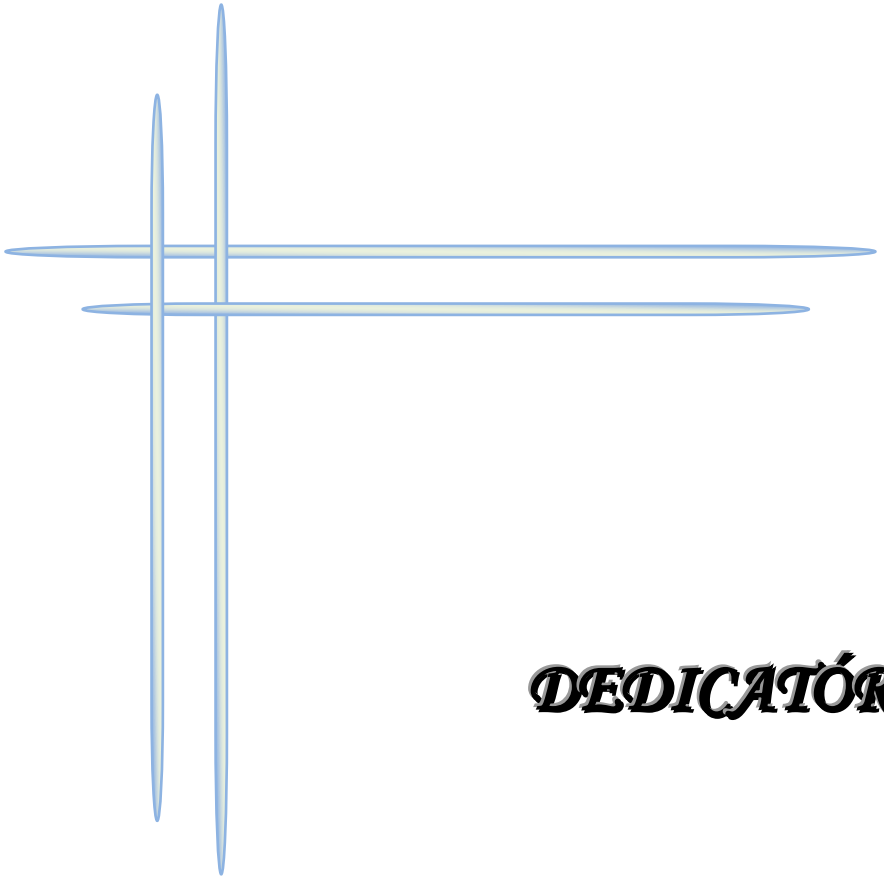
CDD 617.69

DADOS CURRICULARES

AMÁLIA MORENO

NASCIMENTO	31/03/1982 – SÃO BERNARDO DO CAMPO – SP
FILIAÇÃO	José do Serro Moreno Maria das Graças Pereira
2003/2008	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araçatuba, São Paulo, Brasil
2008/2008	Curso de Aperfeiçoamento em Prótese Sobre Implante Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araçatuba, São Paulo, Brasil
2009/2011	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária, nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araçatuba, São Paulo, Brasil

2009/2012	Professora Voluntária da Disciplina de Prótese Total no Curso de Técnico em Prótese Dentária com Habilitação em Auxiliar de Prótese Dentária pelo Instituto Educacional de Araçatuba – UNITENO.
2009/2011	Especialização em Prótese Dentária Centro Federal de Odontologia – CFO/SP.
2010/2010	Curso de Aperfeiçoamento em Prótese Parcial Fixa Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
2011/2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária, nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Araçatuba, São Paulo, Brasil
2013/2013	Estágio de Doutorado no Exterior (Doutorado Sandwich) University of Tennessee at Knoxville – Department of Microbiology Knoxville, Tennessee, USA.
2014	Professora Substituta das Disciplinas de Prótese Bucomaxilofacial e Atenção Integral ao Adulto I do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais.



DEDICATÓRIA

"A vontade de Deus nunca irá levá-lo onde a graça de Deus não possa protegê-lo"

|Autor desconhecido|

A **Deus**, razão de todas as coisas, agradeço todos os dias por me permitir esta oportunidade de viver, por todas as bênçãos recebidas e por iluminar sempre o meu caminho, pela fé que me fortalece a cada dia e possibilita que eu siga sempre em frente.

Dedico esta conquista de coração!

"Minha primeira lágrima caiu dentro dos teus olhos

Tive medo de a enxugar: para não saberes que havia caído."

|Cecília Meireles|

A minha querida e maravilhosa mãe **Graça**, por seu amor e compreensão incondicionais. Muito obrigada mesmo diante de tantas dificuldades, me proporcionou todas as condições possíveis para que eu pudesse chegar até aqui, dando-me todo o incentivo, apoio e confiança, que me fizeram seguir este caminho com coragem e determinação. Agradeço por ser extremamente dedicada aos seus filhos, com certeza o seu amor foi minha principal fonte de luz durante esta jornada. Estar com você enche meu coração de alegria e pensar em ti é ter a paz de uma vida segura.

Amo muito você.

Dedico esta conquista com muito amor e gratidão!

"Os sonhos mais lindos, sonhei... de quimeras mil um castelo ergui..."

|Marchetti e Armando Louzada|

Ao meu querido pai **José** por me ensinar desde tão cedo a importância de ajudar ao próximo, estudar e torna-se um bom cidadão. Obrigada pelo incentivo sempre.

Você está no meu coração.

Com alegria e satisfação dedico esta conquista!

As minhas irmãs, **Rose e Aimara**, e a minhas lindas sobrinhas, Giovanna, Vivian e Júlia; e meu sobrinho Márcio. Obrigada por entenderem a minha distante presença e trazerem tantas alegrias em momentos de reencontro. Vocês são preciosos presentes em minha vida!

Muito Obrigada! Querida família.

Dedico este trabalho com muito amor e carinho!

"Tell me, and I forget.

Teach me, and I may remember.

Involve me and I learn ."

|Benjamin Franklin|

Ao Professor **Marcelo Coelho Goiato**, meu orientador. Meu professor o que eu posso dizer do Senhor? Querido Professor você é responsável pelo acontecimento de tudo! Eu sou eternamente grata por tudo que fez por mim todos estes anos de graduação e pós-graduação. Obrigada por me aceitar como sua aluna, mesmo não me conhecendo na graduação, mas como estagiária. Obrigada por ser esta pessoa sensível, inteligente e companheira, sempre ao lado de seus alunos. Obrigada por ter acreditado em mim e me proporcionado todo suporte. Suporte este que me fez crescer tanto e acreditar que tudo vale a pena, e o principal é fazer o bem aos outros. Obrigada pelas incontáveis oportunidades de aprendizado clínico e principalmente pela participação científica nos grupos de pesquisa, as quais me proporcionou e eu jamais esquecerei. Obrigada professor por fazer parte da minha vida e se preocupar comigo não apenas hoje mas

também com meu futuro. Tenho o professor como um presente eterno em minha vida. Tenho certeza que ilumina quem passa por seu caminho, assim como fez comigo. Pois você, meu adorável professor, é e sempre será muito especial para mim.

A você minha imensa gratidão e admiração por tudo que fez e continua fazendo por seus alunos sempre!

Com muito carinho dedico esta conquista!

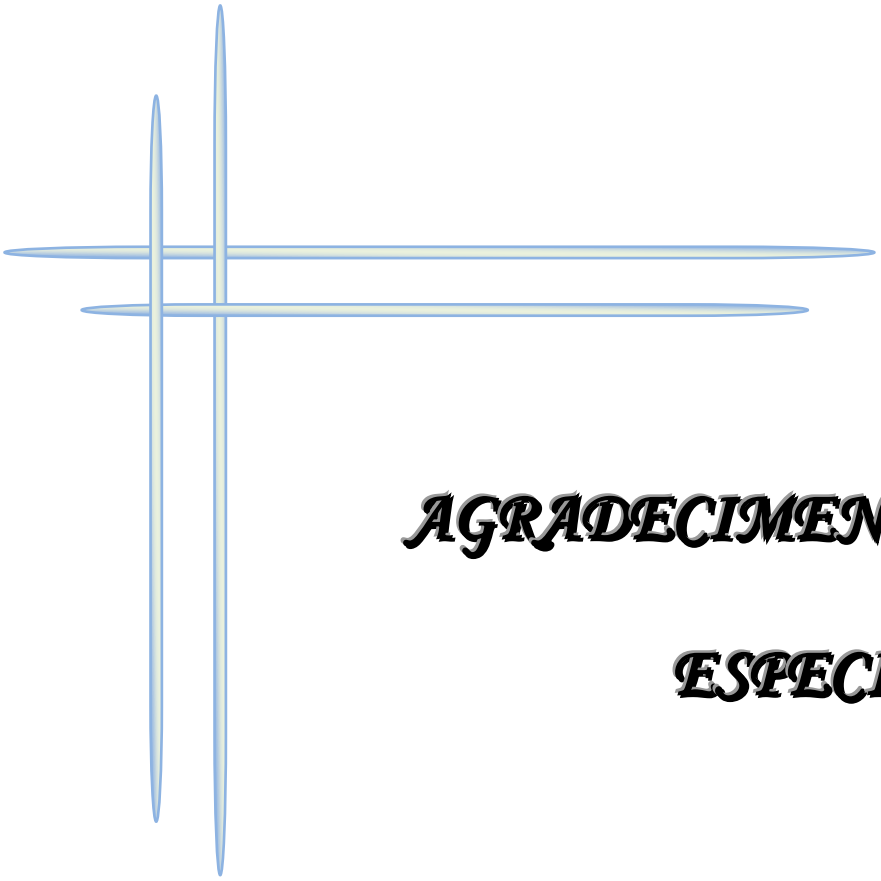
"As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem"

| Lilian Tonet |

Ao **Emerson Gomes dos Santos**, uma pessoa especial na minha vida. Emerson hoje eu tenho certeza que foi Deus quem te colocou na minha vida. Eu sou eternamente grata por tudo que fez por mim, desde o mestrado. Eu poderia passar toda a minha vida te agradecendo e mesmo assim não seria suficiente. Você mesmo sabe tudo que fez por mim. Toda a ajuda nesta minha caminhada, em todos os momentos, e por todo o suporte com minha mãe, em tempos difíceis. Além disso, também quero te agradecer muito pelas incontáveis consultas estatísticas em que me ajudou, as quais sem o seu conhecimento e dedicação seriam muito mais difíceis de serem concluídas. Na verdade, eu quero te dizer que você é uma pessoa maravilhosa na minha vida.

Obrigada por existir e estar comigo!

Dedico com muito amor e gratidão este trabalho!



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Professora **Daniela Micheline dos Santos**, minha amiga. Dani você é uma pessoa rara de se encontrar! E porque? Esta resposta está em cada ação maravilhosa sua. Eu tenho muito que agradecer a você as inúmeras vezes em que me ajudou, não somente na faculdade, com pesquisas e ensinamentos clínicos que você domina tão bem, mas em várias outras situações, em que você me trouxe conforto e segurança. Você é muito e muito especial na vida de quem está. E eu agradeço muito por ter te conhecido. Tenha certeza de que a sua luz alcança a imensidão.

Muito obrigada minha amiga "do coração" por estar ao meu lado sempre que precisei!

Ao Professor **Jeffrey M. Becker**, pelo aceite inicial no exterior. Professor agradeço muito ao Senhor pela chance que me deu de realizar o estágio de pesquisa no exterior. Sem me conhecer, em outro país e língua, e apenas por e-mail, deu me a chance de apresentar uma proposta e posteriormente realizar um estudo em seu ambiente de trabalho e conquista. Serei sempre grata por esta oportunidade de aprendizado em uma Universidade renomada. Lembro muito bem como se fosse hoje quando li suas escritas, as quais tiraram me lágrimas de alegria "Go ahead and write a detailed outline of your project, send to me, and we'll see where we go from there". Agradeço ao Senhor pela chance que me proporcionou, para que meu sonho de realizar um estágio no exterior ser tornasse real.

Muito obrigada pela oportunidade oferecida!

A Professora **Elizabeth Marie Fozo**, minha orientadora estrangeira. Professora muito obrigada pelo conhecimento de microbiologia transmitido e a oportunidade de trabalho em seu laboratório no exterior. Agradeço também pela participação em aulas teóricas, bem como em cursos oferecidos. Muito Obrigada!

Agradeço por fazer parte de minha trilha na pós-graduação!

Ao Professor **Valentim Adelino Ricardo Barão**, meu amigo. Amigo lindo quem é você? Às vezes me pergunto se você realmente existe ou é simplesmente um sonho. Eu agradeço muito pela ajuda que me proporcionou na pós-graduação. Aprendi muito com você, e não apenas conhecimento científico, este que em particular eu sei que você tem de sobra, mas aprendi muito mesmo a querer e fazer o bem a todo o momento. Agradeço pelas nossas conversas, pela ajuda essencial no inglês que você domina tão bem, e todo suporte em tudo que precisei.

Você é um exemplo de competência e humildade: as duas mais preciosas virtudes que um homem pode ter. Obrigada por ser meu amigo e trazer alegria e vida a quem você conhece. Porque você é realmente incrível. Com certeza você é o melhor que eu já conheci.

A você meus agradecimentos com muito carinho!

A **Thaís Iumi Umeda Suzuki**, minha amiga. Thá minha querida companheira de pós-graduação. Um pessoa tranquila, de coração enorme e inteligente! Você me conquista a cada dia com sua simplicidade. Agradeço muito por tê-la como amiga e por nossos momentos na pós-graduação e também fora dela. Você é uma benção na vida de quem participa. Obrigada por estar na minha vida.

Agradeço por nossa amizade crescer a cada dia!

Ao Professor **Aldiéris Alves Pesqueira**, meu amigo. Aldinho quem te conhece sabe que só tem a ganhar. Eu agradeço muito por te conhecer e ter você ao meu lado sempre que precisei. Você é uma pessoa inteligente, gentil, boa, e extremamente alegre. Muito obrigada por me ajudar com a tese e em vários outras coisas. Eu fico muito feliz e agradecida com isso. Querido amigo, você é encantador.

Muito obrigada por tudo que fez por mim!

A Professora **Marcela Filié Haddad**, querida amiga.

Quero te agradecer pela atenção dedicada desde o mestrado. Você despertou em mim o interesse de sempre ajudar ao próximo, com seu brilhantismo e dedicação. Com sua atenção, disponibilidade e conhecimento conquista o carinho de todos. Agradeço pelos agradáveis momentos que estive ao seu lado.

Muito obrigada Má por toda a ajuda sempre!

A **Luciana da Silva Meira**, minha amiga. Lu, minha amiga de tempos! Fizemos a quinta série do primeiro grau juntas e desde então, nunca mais nos separamos no coração. Querida amiga, mesmo estando longe todo este tempo, você sabe que sempre esteve comigo. Obrigada por tudo até hoje. Você sempre me ajudou muito, desde o colégio. E neste meu período de pós-graduação não foi diferente. Obrigada pela nossa amizade, pela preocupação comigo e com minha família. Agradeço por esta amizade, que para mim é valiosa. Você sabe que está comigo o tempo todo e agradeço muito pela reciprocidade.

Obrigada amiga pela confiança e ajuda em momentos especiais!

A **Heloísa Fonseca Marão**, minha amiga. Helo, querida amiga de moradia. Desde o início quando te conheci já gostei muito de você. Você é daquelas pessoas que irradiam o ambiente. Tem muita alegria e disposição sempre. Agora quero te agradecer por ter ti conhecido e pelos momentos tão agradáveis de convivência contigo. Muito obrigada por toda a ajuda sempre, principalmente em minha ida ao exterior. Você fez parte da minha vida na pós-graduação e espero que continue sempre. Pois você é uma amiga para sempre.

Muito obrigada pelos belos anos de convivência!

A **Maria Del Pilar**, minha amiga. Pilar, minha amiga estrangeira! Menina de prestígio e inteligência. Você é um exemplo de esforço e competência. Obrigada por ser tão boa e dedicada quando eu precisei de ajuda. Agradeço pela preocupação que teve comigo desde o momento em que te conheci. Sua amizade neste tempo de convivência me fez valorizar a importância de termos amigos e bons amigos. Muito obrigada querida amiga pelo tempo em que estive ao seu lado.

Obrigada por ser especial na minha vida!

Ao **Jânder de Carvalho Inácio**, meu amigo e companheiro em muitos momentos de trabalho. Querido Jânder, grande amigo. Você é um exemplo de profissional competente, inteligente e ético. Muito obrigada por toda a ajuda sempre desde a graduação, mas principalmente durante o Doutorado. Você pode não ter idéia do quanto foi maravilhoso comigo, desde as várias caronas até todos os ensinamentos protéticos que me passou. Agradeço sua paciência e disponibilidade sempre que precisei. Você é inesquecível.

Muito obrigada por tudo!

Ao **Eduardo Rodrigues Cobo**, querido amigo de fotografias e estudos em prótese fixa. Caro Eduardinho, você fez uma diferença muito grande no meu último período do doutorado. Eu agradeço muito pela acessibilidade que me proporcionou em seu ambiente de trabalho tirando dúvidas e colaborando com vários casos clínicos. Obrigada por toda esta ajuda e incentivo na pós-graduação. Você é uma pessoa de coração enorme. Agradeço por tudo sempre.

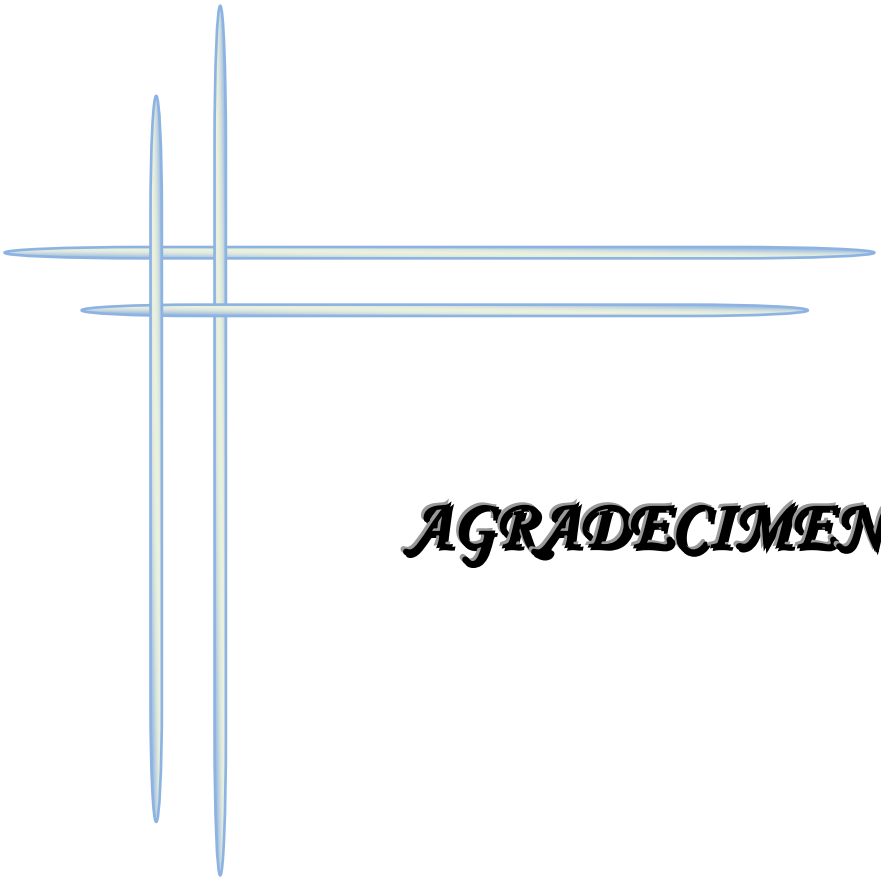
Deixo aqui meus sinceros agradecimentos!

A **Agda Marobo Andreotti**, minha amiga de pós-graduação. Guida, minha amiga, como tenho imensa simpatia por você. Tenho muito a te agradecer pela ajuda neste trabalho e no inglês. Tenho muita admiração por você ser tão bondosa e gentil sempre. Agradeço pelas nossas caminhadas e alegrias no departamento em dias de trabalho. Sua amizade para mim é ímpar.

Obrigada por ser especial na minha vida!

Ao **Aljomar José Vechiato Filho**, meu companheiro pós-graduação. Aljo, eu te conheci quando você ainda estava na graduação e olha só nossa você cresce em conhecimento muito rapidamente. Muito obrigada por tudo que já me ensinou principalmente em estética dental. Você é uma pessoa muito boa, acredito que todos que te conhecem sentem isso, desde o primeiro momento. Agradeço por todos os momentos em que me ajudou sem nunca pedir nada em troca. Você tem muitas virtudes, com certeza terá um futuro brilhante. Pois você merece tudo de melhor.

Obrigada por todos os momentos de ajuda e alegria!



AGRADECIMENTOS

"Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha."

|Autor desconhecido|

À **Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba** – UNESP, pelo crescimento científico e profissional.

À **University of Tennessee (UT) – Department of Microbiology** pela oportunidade em desenvolver o estágio no exterior.

A **Fapesp (Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo)**, pela concessão de bolsa de Doutorado no País e Estágio de Doutorado no Exterior possibilitando a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais**, pela oportunidade de docência no curso de graduação em Odontologia.

A Coordenadora do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Profa. Maria José Hitomi Nagata, pelo excelente exemplo na pesquisa científica e incentivo aos futuros profissionais.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, em especial Valéria Zagatto pela atenção, orientação e cordialidade. Aos **docentes e funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** e **do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais** por todos os ensinamentos transmitidos.

Em especial aos **Professos da disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**: **Prof. Adj. Eduardo Piza Pellizzer** pela disponibilidade e exemplo de competência clínica e experimental; **Prof. Adj. Paulo Renato Junqueira Zuim** pelas oportunidades, e aprendizado constante; **Prof. Ass. Felipo Ramos Verri** pela receptividade e atenção sempre que precisei; e a **Profa. Ass. Karina Helga Leal Túrcio** pelo carinho, amizade, e oportunidades de trabalho.

Ao **Prof. Ass. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon da disciplina de Prótese Parcial Fixa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP,** pelo exemplo de simpatia, e amizade.

Aos **Professores da disciplina da Atenção Integral ao Adulto I da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais**: **Profa. Adj. Célia Regina Moreira Lanza** pela receptividade e aceite do convite a banca; **Prof. Adj. João Baptista Novaes** pela simpatia e descontração na disciplina; **Prof. Adj. Ivan Doche Barreiros** pela atenção e aprendizado sempre que precisei; e **Profa. Ana Cristina** pelo carinho e amizade nesta nova fase de minha vida.

Ao **chefe do Departamento de Cirurgia, Patologia e Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Prof. Adj. Ricardo Alves de Mesquita** e a **Profa. Adj. Denise Travassos** pela orientação e toda ajuda prestada junto a disciplina de Prótese Buco-Maxilo-Facial sempre que precisei.

Ao **técnico de laboratório da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Murilo Miranda Queiroz** pela simpatia, conhecimento transmitido e carinho junto a disciplina de Prótese Buco-Maxilo-Facial.

A **Profa Elidiane Cipriano Rangel** e ao **Prof. Nilson Cruz da Faculdade de Engenharia da UNESP (Campus de Sorocaba)**

pela realização da microscopia eletrônica de varredura, EDS e possibilidade de análise da energia de superfície das amostras.

Ao amigo de turma **Joel Ferreira Santiago Júnior**, por todos os momentos de apoio, e incentivo para prosseguir na caminhada. As queridas amigas de graduação e pós-graduação em outra área: **Daniele Camara, Marcelle Danelon, Carla Oliveira Favretto, Adrielle Mendes, Ligia Lavezo Ferreira e Glaucia Resende Soares** cujo apoio, incentivo e amizade foram fundamentais.

Aos grandes amigos de pós-graduação **Adhara Smith Nóbrega, Caroline Cantiere, Rosse Mary Falcón Antenucci, Liliane Bonatto, Emily Freitas da Silva, Mariana Vilela Sonego, Rodrigo Antônio de Medeiros, Leonardo Faverani, Daniel Augusto Almeida, Douglas Roberto Monteiro, e Aline Satie** que contribuíram diretamente durante o desenvolvimento desta tese ou que me doaram forças para concluí-la.

Aos alunos de iniciação científica **Marcela Borghi, Cecília Alves de Sousa, Murilo César Júnior, Fernanda Bimbato de Menezes, Kamila Freitas Oliveira, Bruna Egumy Nagay e Guilherme Sousa** que me incentivaram no constante aprendizado.

Às queridas amiga de moradia **Lamis Nogueira Meorin** e **Juciléia Maciel** pelos momentos de alegria.

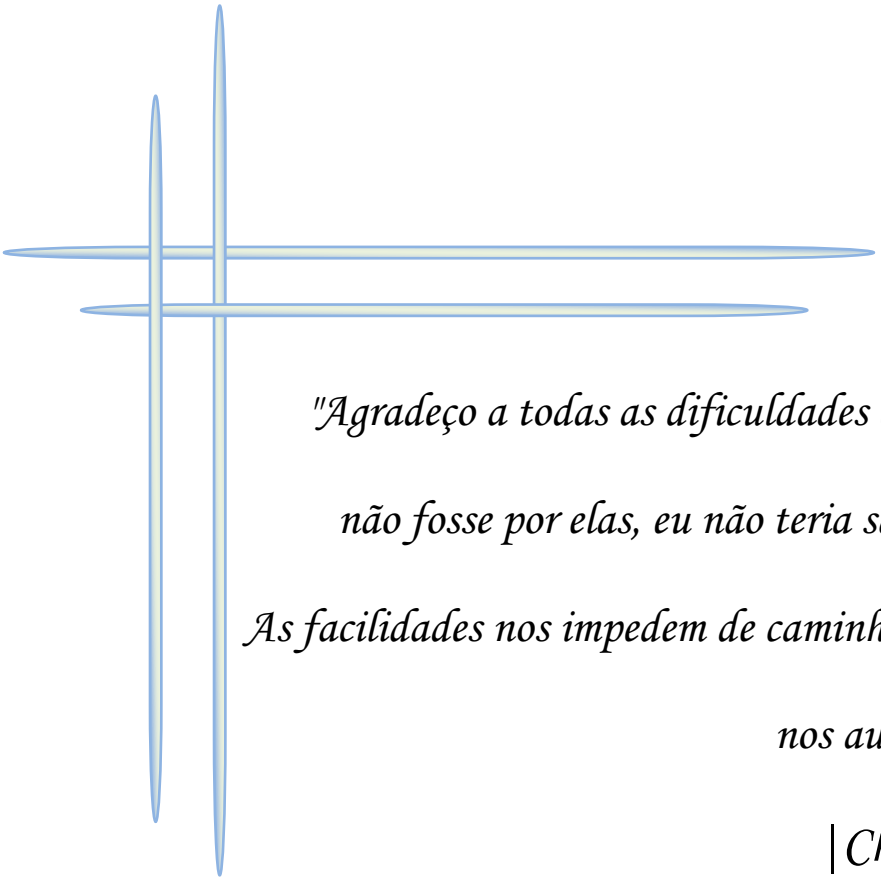
Aos técnicos de laboratório no exterior **Daniel Won e Thomas Brandenburg**, muito obrigada por toda a ajuda sempre que precisei e pela companhia.

Aos professores da Banca de Qualificação: **Profa. Ass. Roberta Okamoto e Prof. Adj. Glauco Issamu Miyahara** pelas observações e toda a ajuda prestada ao longo do curso.

Aos **bibliotecários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela dedicação, pelos ensinamentos, colaboração e presteza durante todo o período de elaboração deste trabalho.

Aos **professores, técnicos, estagiários e voluntários do Centro Oncológico Bucal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela convivência gratificante durante todo esse percurso. Aos **pacientes**, que me mostraram a real importância da pesquisa.

Aos **alunos da disciplina de Prótese Buco-Maxilo-Facial da FO-UFMG**, pelo extremo interesse no aprendizado a esta especialidade e incentivo na universidade.



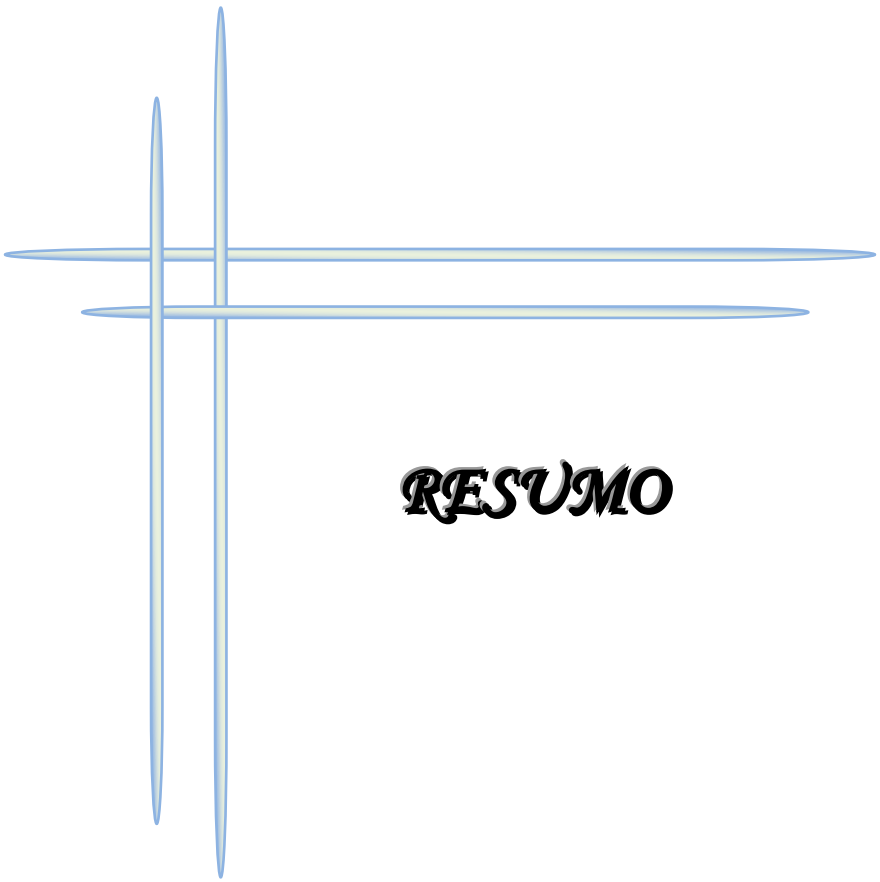
"Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei;

não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar, as críticas

nos auxiliam muito"

| Chico Xavier |



RESUMO

MORENO A. **Avaliação da adesão de *Staphylococcus* spp. em resina acrílica específica para prótese ocular e alteração de cor de botões de íris artificiais, variando a cor e as técnicas de obtenção, ambos após desinfecção química** [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

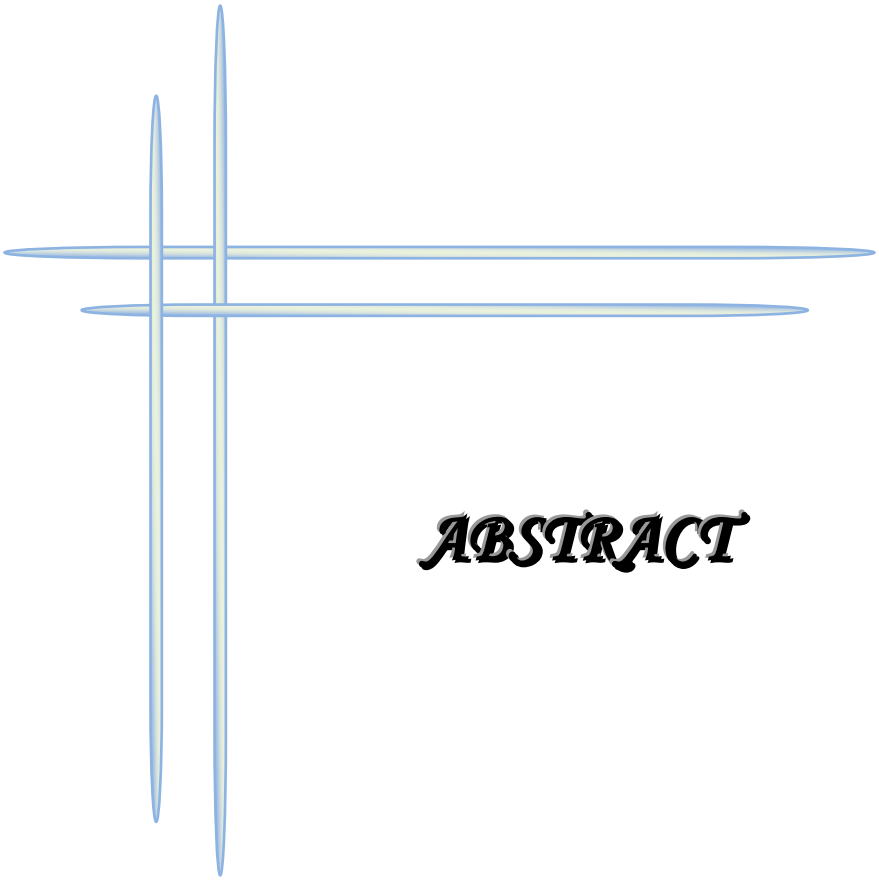
As próteses oculares são responsáveis pela recuperação da estética e auto-estima do usuário. Assim, os materiais utilizados na confecção de prótese ocular devem possuir propriedades específicas para sua indicação e durabilidade principalmente aos procedimentos de desinfecção pelo paciente. Desse modo, este estudo teve como objetivo verificar a efetividade de diferentes soluções desinfetantes na remoção de biofilme de duas espécies de *Staphylococcus* spp., desenvolvidas na superfície de resina acrílica específica para prótese ocular e avaliar a alteração de cor de botões de íris artificiais confeccionadas por diferentes técnicas antes e após a polimerização e quando influenciadas pela desinfecção química. Para o teste de microbiologia, 396 amostras em resina acrílica para prótese ocular N1 foram confeccionadas (1,0 cm em diâmetro e 0,3 cm em espessura), sendo metade dessas amostras para formação de biofilme de *S. epidermidis* e a outra metade para formação de biofilme de *S. aureus*, ambos na superfície da amostra. Para cada

cepa bacterina, 66 amostras foram submetidas a formação de biofilme em sua superfície durante três diferentes tempos: inicial (24h), intermediário (48h) e maduro (72h). Em seguida as amostras foram distribuídas aleatoriamente (unidade amostral n=6) para um dos tratamentos desinfetantes: água destilada durante 10, 15, 30 min e 6 h (controle-CTL); sabão neutro (NES) durante 30 min; Opti-Free® durante 30 min e 6 h; Efferdent® (EFF) durante 15 min; e gluconato de clorexidina (0,5%; 2% e 4%) (CHX) durante 10 min. Após o tratamento desinfetante, as amostras acrílicas foram imediatamente agitadas para desprendimento do biofilme. A contagem de colônias foi verificada por análise do número de UFC/mL. Para a análise de alteração de cor 300 amostras simulando próteses oculares foram confeccionadas, sendo metade dessas amostras com íris artificial na cor azul e a outra metade na cor marrom. Para cada cor, cinquenta amostras de cada técnica empregada (técnica convencional (PE), técnica com calota pré-fabricada (CA) e pintura invertida (PI)) foram confeccionadas. Para cada técnica empregada, 10 amostras foram submetidas a três tipos de soluções desinfetantes (sabão neutro (NES), Opti-Free (OPF) e clorexidina a 4% (CHX)); ou permaneceram sem desinfecção (C1, imersas em soro fisiológico e C2 restritas a ambiente seco). A desinfecção foi realizada por 240 dias, sendo as amostras desinfetadas, armazenadas em soro fisiológico durante esse período. A leitura de cor das amostras foi realizada por um espectrofotômetro, usando o sistema CIE L*a*b* antes da polimerização da resina incolor (B_1),

logo após a sua confecção (B_2), e após 60 (T_1), 120 (T_2) e 240 (T_3) dias de desinfecção e armazenagem. As diferenças de cor (ΔE) foram calculadas para os períodos entre B_2 e B_1 (B_2B_1), T_1 e B_2 (T_1B_2), T_2 e B_2 (T_2B_2) e T_3 e B_2 (T_3B_2). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer (α=0,05). Pode-se verificar menores valores de UFCs para os tratamentos com CHX e EFF, com diferença significante (*P*<0,001), quando comparados com os respectivos grupos controles para ambas as cepas, em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme. O tratamento de CHX durante 10 min em todas as concentrações apresentou amplo espectro antimicrobiano contra *Staphylococcus* spp em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme. (*P*<0,0001). Em relação a avaliação de alteração de cor, observou-se que o botão de íris artificial de todas as amostras apresentou alteração de cor tanto após a polimerização da resina acrílica incolor quanto após os períodos de desinfecção e armazenagem. As amostras com botão de íris artificial de cor marrom apresentaram maior estabilidade de cor (*P*<0,05) em relação a cor azul tanto após polimerização da resina incolor quanto durante o período de desinfecção e armazenagem para todas as técnicas. Em relação a alteração de cor verificada após a polimerização da resina incolor, as amostras com botão de íris artificial confeccionado pela técnica CA (ΔE=6,79 na cor azul e ΔE=4,93 na cor marrom) apresentaram os maiores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,05). Para o botão de íris de cor marrom, as amostras

confeccionadas pela técnica PI (ΔE=0,64) apresentaram os menores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,05). Em relação a alteração de cor verificada ao longo do período de desinfecção e armazenagem, as amostras de botão de íris na cor azul confeccionadas pelas técnicas PE e CA apresentaram maior estabilidade de cor (*P*<0,001), após o período de desinfecção e armazenagem. As amostras com botão de íris artificial desinfetados com CHX apresentaram maiores valores de alteração de cor (*P*<0,001), em relação aos tratamentos controle, para ambas as cores e técnicas. Pode-se concluir que os tratamentos com peróxido alcalino e gluconato de clorexidina foram efetivos na remoção do biofilme de *Staphylococcus* spp. da superfície da resina acrílica para todos os períodos de desenvolvimento do biofilme. O tratamento realizado com gluconato de clorexidina mostrou ocasionar maior alteração de cor do botão de íris aritifical, para ambas as cores. A avaliação da alteração de cor do botão de íris artificial após a polimerização da resina incolor e períodos de desinfecção e armazenagem apresentou diferença significante entre as diferentes técnicas empregadas na sua confecção, para ambas as cores.

Palavras-chave: Desinfecção, Olho artificial, Cor, Resinas acrílicas, Prótese maxilofacial, Biofilmes.



ABSTRACT

MORENO A. **Evaluation of *Staphylococcus* spp adhesion ocular prosthesis acrylic resin and chromatic change of artificial iris buttons fabricated with different techniques and colors after chemical disinfection** [Thesis]. Araçatuba: Sao Paulo State University; 2014.

ABSTRACT

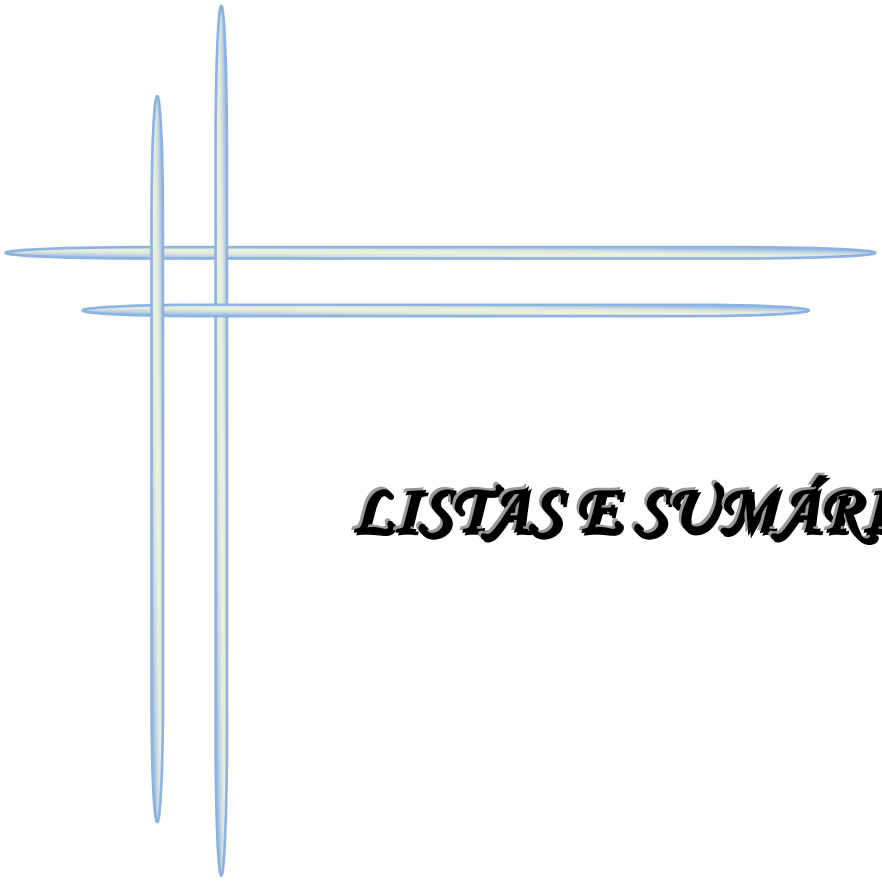
Considering that ocular prostheses restore esthetics and patient's self-esteem, the materials used for prosthesis fabrication should present appropriate properties regarding indication and reliability after the disinfection procedures. So, the aim of this study was to assess the effectiveness of different disinfectant solutions against two species of *Staphylococcus* spp. cultured on ocular prosthesis acrylic resin. In addition, the chromatic change of artificial iris buttons fabricated with different techniques was also evaluated before and after polymerization and disinfection. For the microbiology tests 396 acrylic specimens were fabricated (1.0 cm in diameter and 0.3 cm in thickness). Half of the samples were made for biofilm formation of *S. epidermidis* and half were made for biofilm formation of *S. aureus*, both on the sample surface. For each strain, 66 samples were underwent to biofilm formation on the liner surface for three different points: initial (24h), intermediate (48h) and mature (72h). Afterwards the specimens were randomly assigned (unit sample n = 6) to one of disinfectant treatments: distilled water for 10, 15,

30 min and 6 h (control-CTL); treated with neutral soap (NES) for 30 min; treated with Opti-Free® (OPT) for 30 min and 6 h; treated with Efferdent® (EFF) for 15 min; and treated with (0.5%, 2% and 4%) chlorhexidine gluconate (CHX) for 10 min. After the treatments, the specimens were vortexed to disrupt the biofilm, and residual cells were counted (cell/mL). For the color meansurations a total of 300 samples simulating ocular prosthesis were fabricated. Half of the samples were made with blue artificial irises, and half were made with brown artificial irises. For each color, 50 samples were fabricated according to one of the following techniques: PE – conventional technique, CA – prefabricated cap, and PI – inverted painting. A total of 10 specimens of each technique was submitted to disinfection with neutral soap (NES), Opti-Free (OPF) and 4% chlorhexidine (CHX). The control samples remained immersed in saline solution (C1) or exposed to dry environment (C2). The disinfection was conducted for 240 days and the disinfected samples remained immersed in saline during this period. Chromatic change was measured using a spectrophotometer according to the CIE L*a*b system before polymerization of the colorless resin (B_1); after sample fabrication (B_2); and after 60 (T_1), 120 (T_2) and 240 (T_3) days of disinfection and storage. The chromatic change (ΔE) was calculated between the periods B_2 and B_1 (B_2B_1), T_1 and B_2 (T_1B_2), T_2 and B_2 (T_2B_2), and T_3 and B_2 (T_3B_2). The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey-Kramer test (α=0.05). There was lowest values of CFUs for treatments

with CHX and EFF, with significant difference (*P*<0.001) in comparison to the control groups of each strain in all periods of biofilm development. The treatment with CHX at all concentrations during 10 minutes presented high antimicrobial activity against *Staphylococcus* spp. in all periods of biofilm culture (*P*<0.0001). For chromatic change, all samples presented alteration in artificial iris button color after polymerization of the colorless resin, disinfection and storage. The samples with the artificial brown iris buttons showed greater stability color (*P*<0.05) after polymerization of the colorless resin and period of disinfection and storage for all techniques. Considering the analysis after polymerization of the colorless resin, the artificial irises buttons fabricated with the CA (ΔE=6.79 to blue color and ΔE=4.93 brown color) technique showed the highest values of chromatic change (*P*<0.05). For the brown irises, the PI (ΔE=0.64) samples presented the lowest values of chromatic change (*P*<0.05). Considering the chromatic change during disinfection and storage, blue artificial iris buttons fabricated by PE and CA techniques exhibited greater stability (*P*<0.001), after period of disinfection and storage. The artificial irises buttons disinfected with CHX showed higher values of chromatic change (*P*<0.001), in comparison to the control treatments, for both colors and techniques. It was concluded that the treatments with alkaline peroxide and chlorhexidine gluconate were effective against *Staphylococcus* spp. biofilm cultured on the acrylic resin during all periods of biofilm culture. The treatment with chlorhexidine showed cause greater change color of the iris

aritifical button for both colors. In addition, there was significant difference in color change after colorless resin polymerization; and disinfection period and storage on the artificial irises buttons fabricated with different techniques in both colors.

Keywords: Disinfection, Artificial eye, Color, Acrylic resins, Maxillofacial prosthesis, Biofilms.



LISTAS E SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Amostras finalizadas…….. **68**

Figura 2 - Amostras imersas no meio de cultura inoculado com *S. epidermidis* após 72 horas de desenvolvimento do biofilme (a), e amostras imersas no meio de cultura inoculado com *S. aureus* após 72 horas de desenvolvimento do biofilme (b)..... **71**

Figura 3 - Imagens da MEV (×300 e 10.000 vezes); ângulo de contato formado com a água (a) e o diodo metano (b); e análise EDS da resina acrílica imediatamente após polimento (#120) e previamente a esterilização. O ângulo de contato da gota, com a superfície de resina acrílica foi de 113 e 60 graus, respectivamente..... **75**

Figura 4 - Número de células aderidas de *S. epidermidis* ATCC35984 e *S. aureus* ATCC6538 por mL para cada tratamento desinfetante e período de desenvolvimento do biofilme..... **77**

Figura 5 - Distribuição do ln (número de células aderidas/mL) para tipo de bactéria (a); período (b) e tratamento desinfetante (c)..... **78**

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Obtenção das amostras nas técnicas de confecção do botão de íris artificial antes da polimerização da resina acrílica incolor: técnica convencional na íris cor azul e marrom - PE (A); técnica com calota pré-fabricada - CA (B); técnica da pintura invertida – PI (C)..... **104**

Figura 2 - Amostras finalizadas…….... **105**

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Fluxograma da confecção das amostras..... **128**

Figura 2 - Desenho esquemático das dimensões da matriz metálica e vista superior desta com a calota ocular em posição centralizada..... **129**

Figura 3 - Amostras finalizadas de acordo com as diferentes técnicas de confecção do botão de íris artificial: técnica convencional na íris cor azul e marrom - PE (A); técnica com calota pré-fabricada - CA (B); técnica da pintura invertida – PI (C)..... **132**

ANEXOS

Figura 1 - Materiais odontológicos utilizados no estudo: resinas acrílicas termopolimerizáveis (N1 para esclera artificial e incolor); adesivo líquido J-350 e calotas oculares……..... **167**

Figura 2 - Cepas utilizadas no estudo: *S. epidermidis* e *S. aureus*..... **167**

Figura 3 - Materiais de microbiologia utilizados no estudo:

solução de água destilada estéril; meio de cultura BHI; e glucose..... **167**

Figura 4 - Desinfetantes utilizados no estudo: sabão neutro, Opti-Free, Efferdent e gluconato de clorexidina..... **168**

Figura 5 - Forno microondas com 1400 W (BC 30 LTS Maxi; Brastemp, São Paulo, SP,Brasil)..... **168**

Figura 6 - Paquímetro digital (500-171-20B; Mitutoyo, Tóquio, Japão)..... **168**

Figura 7 - Politriz automática (Ecomet 300PRO; Buehler, Illinois, EUA)..... **169**

Figura 8 - Estufa bacteriológica digital (CE-150/280I; CIENLAB Equipamentos Científicos Ltda., Campinas, São Paulo, SP, Brasil)..... **169**

Figura 9 - Microscopia eletrônica de Varredura (JSM 610LA; JEOL, Tóquio, Japão)..... **170**

Figura 10 - Goniômetro (Ramé-Hart 100-00; Ramé-Hart Instrument Co., Alemanha)..... **170**

Figura 11 - Espectrofotômetro ultravioleta visível (Evolution 60S; Thermo Scientific, EUA)..... **171**

Figura 12 - Aparelhos e instrumentos utilizados para a obtenção da contagem de bactérias: vortex mixer (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), mesa para espalhamento de bactéria, contador de colônias (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e espátula de Drigalsky..... **171**

Figura 13 - Incubadora (C24 Incubator Shaker; Edison, NJ, EUA)..... **171**

Figura 14 - Espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível (UV-2450; Shimadzu Corp, Kyoto, Japão)..... **172**

Figura 15 - Dispositivo para padronizar a área de leitura de cor das amostras..... **172**

Figura 16 - Desenho esquemático representativo do Sistema CIE L*a*b*……. **172**

Figura 17 - Vista superior da matriz metálica preenchida com cera 7 e união do conjunto (matriz metálica e placa de vidro) com silicone de condensação extra-duro... **173**

Figura 18 - Conjunto (matriz metálica e placa de vidro) incluídos na base da mufla e placa de vidro incluído na contra-mufla..... **173**

Figura 19 - Monômero e polímero da resina acrílica N1 devidamente proporcionados e vertidos no pote de vidro para manipulação de resina..... **173**

Figura 20 - Inserção da reina acrílica no interior dos círculos vazados da matriz incluída na base da mufla……. **174**

Figura 21 - Prensagem e polimerização da resina acrílica N1.... **174**

Figura 22 - Etapas finais de confecção das amostras em resina acrílica: acabamento das amostras com fresa maxicute, amostras finalizadas após polimento e esterelização……..... **174**

Figura 23 - Culturas de *Staphylococcus* spp inicadas em BHI e mantidas em crescimento a 37°C…….. **175**

Figura 24 - Amostras em meio de cultura inoculado com *Staphylococcus* spp e mantidas sob agitação para desenvolvimento do biofilme..... **175**

Figura 25 - Amostras colocadas em uma nova placa de seis poços com troca do meio de cultura a cada 24 horas..... **176**

Figura 26 - Amostras imersas no meio de cultura inoculado com *S. epidermidis* após 72 horas de desenvolvimento do biofilme; e amostras imersas no meio de cultura inoculado com *S. aureus* após

72 horas de desenvolvimento do biofilme..... **176**

Figura 27 - Desinfecção das amostras após desenvolvimento do biofilme; desprendimento do biofilme por vortex e visualização de dois tubos falcão antes e após desprendimento do biofilme..... **177**

Figura 28 - Processo de espalhamento da bactéria na placa petri: remoção de 100 microlitros do volume contido no ependorf em triplicata, infiltração desta alíquota na placa petri; e espalhamentodo do conteúdo com espátula flamblada..... **177**

Figura 29 - Placas Petri incubadas a 37°C por 24 horas e contagem do número de colônias formadas por mililitro..... **177**

Figura 30 - Desenho esquemático da matriz metálica com suas dimensões e visto superior da mesma..... **178**

Figura 31 - Desenho esquemático da matriz metálica com a calota em posição centralizada e vista lateral da mesma..... **178**

Figura 32 - Conjunto (matriz metálica e calota incolor) incluídos em mufla para obtenção de moldes de silicone……. **179**

Figura 33 - Preenchimento da região (seta) corresponde à calota no molde de silicone..... **179**

Figura 34 - Preenchimento do molde com resina acrílica N1..... **180**

Figura 35 - Blocos de resina acrílica N1 após polimerização..... **180**

Figura 36 - Íris artificiais e calotas oculares pintadas…… **181**

Figura 37 - Obtenção das amostras nas técnicas de confecção do botão de íris artificial antes da polimerização da resina acrílica incolor: técnica convencional na íris cor azul e marrom - PE (A); técnica com calota pré-fabricada - CA (B); técnica da pintura invertida – PI

(C)..... **181**

Figura 38 - Discos de cartolina pintados e fixados com adesivo no centro da placa de resina acrílica N1. Prensagem da resina acrílica incolor sobre a pintura do disco em papel (PE)..... **182**

Figura 39 - Fixação da pintura dos discos de cartolina na base das calotas oculares; e posicionamento deste conjunto (disco e calota) no centro da placa de resina acrílica N1. Prensagem da resina acrílica incolor sobre a calota ocular (CA)..... **182**

Figura 40 - Fixação das bases das calotas oculares pintadas no centro da placa de resina acrílica N1. Prensagem da resina acrílica incolor sobre a calota ocular (PI)..... **183**

Figura 41 - Desinclusão da mufla após prensagem e polimerização da resina incolor..... **183**

Figura 42 - Acabamento e polimento das amostras..... **184**

Figura 43 - Amostras finalizadas com botão de íris na cor azul e marrom..... **184**

Figura 44 - Armazenagem das amostras imersas em soro fisiológico no interior de recipientes opacos em estufa bacteriológica a ±37°C..... **185**

Figura 45 - Desinfecção das amostras com sabão neutro…… **185**

Figura 46 - Desinfecção das amostras com Opti-Free e clorexidina……..... **185**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

et al.	= e colaboradores
mm	= milímetro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}m)
cm	= centímetro (unidade de medida equivalente a 10^{-2}m)
g	= grama (o grama)
µm	= micrômetro
W	= Watt
Ind. Com. Ltda.	= Indústria e Comércio Limitada
mL	= mililitro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}L)
min	= minuto
h	= hora
nº	= número
%	= porcentagem
kgF	= quilograma força
°C	= Graus Celsius
SP	= São Paulo
RJ	= Rio de Janeiro
EUA	= Estados Unidos da América
MEV	= Microscopia Eletrônica de Varredura
UFC/mL	= unidades formadoras de colonia por mililitro
ΔE	= unidade de alteração cromática
UV	= Radiação ultravioleta
ln(x)	= logarítmica natural de x

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Soluções desinfetantes utilizadas no estudo..... **65**

Tabela 2 - Resultados de ANOVA três fatores para ln (número de células aderidas/mL)..... **76**

Tabela 3 - Contagem de células/mL para *Staphylococcus spp.* após os tratamentos desinfetantes em cada período de desenvolvimento do biofilme (Média e Desvio Padrão; n = 6)…….. **186**

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Materiais utilizados para a confecção das amostras..... **101**

Tabela 2 - Resultados de Análise de Variância (ANOVA) dois-fatores..... **109**

Tabela 3 - Valores médios e Desvio Padrão (DP) de alteração de cor (ΔE) das amostras..... **109**

Tabela 4 - Valores médios (DP) de ∆L, ∆a e ∆b das diferentes técnicas de confecção de botão de íris artificial para as duas tonalidades de cor..... **110**

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Materiais utilizados para a confecção das amostras..... **127**

Tabela 2- Valores médios e Desvio Padrão (DP) de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris

artificiais..... **137**

Tabela 3- Resultados de Análise de Variância (ANOVA) quatro-fatores medidas repetidas..... **138**

Tabela 4- Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais para tonalidade de cor, técnica e período, independente do desinfetante utilizado..... **140**

Tabela 5- Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais para tonalidade de cor, desinfetante e período, independente do técnica utilizada..... **140**

Tabela 6- Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais para técnica, desinfetante e período, independente da tonalidade de cor..... **141**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL..... **52**

2 CAPÍTULO 1 – **AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO QUÍMICA NA REMOÇÃO DE BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP EM SUPERFÍCIE DE RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR**..... **58**

2.1 RESUMO……..... **59**

2.2 INTRODUÇÃO ……... **61**

2.3 PROPOSIÇÃO ……... **63**

2.4 MATERIAIS E MÉTODO……... **64**

2.5 RESULTADOS……..... **74**

2.6 DISCUSSÃO……... **80**

2.7 CONCLUSÃO..... **86**

2.8 REFERÊNCIAS……... **87**

3 CAPÍTULO 2 – **ESTABILIDADE DE COR DE BOTÕES DE ÍRIS ARTIFICIAIS VARIANDO A COR E AS TÉCNICAS DE OBTENÇÃO EM PRÓTESE OCULAR ANTES E APÓS POLIMERIZAÇÃO DA RESINA ACRÍLICA INCOLOR**..... **94**

3.1 RESUMO……..... **97**

3.2 INTRODUÇÃO ……... **96**

3.3 PROPOSIÇÃO ……... **99**

3.4 MATERIAIS E MÉTODO……... **100**

3.5 RESULTADO……... **108**

3.6 DISCUSSÃO……... **111**

3.7 CONCLUSÃO..... **115**

3.8 REFERÊNCIAS……..... **116**

4 CAPÍTULO 3 – **EFEITO DE SOLUÇÕES DESINFETANTES SOBRE A ESTABILIDADE DE COR DE BOTÕES DE ÍRIS ARTIFICIAIS OBTIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS PARA DUAS TONALIDADES DE COR**..... **120**

4.1 RESUMO……..... **121**

4.2 INTRODUÇÃO ……... **123**

4.3 PROPOSIÇÃO ……... **125**

4.4 MATERIAIS E MÉTODO……... **126**

4.5 RESULTADO……... **136**

4.6 DISCUSSÃO……... **142**

4.7 CONCLUSÃO..... **147**

4.8 REFERÊNCIAS……..... **148**

Anexo A - Normas das revistas selecionadas para a publicação dos artigos..... **155**

Anexo B - Ilustrações da fase laboratorial da metodologia experimental..... **167**

Prótese Bucomaxilofacial

M C G

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A prótese ocular está entre as várias modalidades da prótese bucomaxilofacial, sendo um tratamento reabilitador artificial para os pacientes que sofreram perda total ou parcial do bulbo ocular. As perdas do globo ocular podem ser por traumas, oncologia ou malformações genéticas. Embora essa prótese não devolva ao seu portador a função primordial, ou seja, a visão, mantém preenchida a cavidade anoftálmica, restaurando a direção lacrimal e prevenindo o acúmulo desse fluido na cavidade. Além disso, a aparência estética do paciente também é melhorada, contribuindo para o seu desenvolvimento psíquico social e melhor qualidade de vida.

Entre os materiais utilizados na reabilitação ocular, as resinas acrílicas são consideradas de eleição por apresentar características singulares como baixo custo, boa adaptação e biocompatibilidade, fácil manipulação e estética satisfatória. Durante a confecção da prótese ocular, alguns aspectos importantes na sua dissimulação devem ser considerados, como sua leveza, morfologia da face anterior, escolha correta das cores da íris artificial e esclera. A prótese ocular é constituída pela esclerótica, confeccionada com resina acrílica branca, caracterizada por vênulas, representando a esclera do olho humano. Sobre essa esclerótica é posicionado o botão de íris

artificial, que é a associação da pintura com a calota incolor. Esta última pode ser confeccionada industrialmente, ou obtida por meio da prensagem de resina acrílica sobre a pintura. Essa camada de resina incolor pode variar de 1 a 3,5 mm, permitindo, pela sua translucidez, a perfeita visualização da íris artificial, em profundidade e naturalidade, semelhante ao olho natural, a fim de alcançar estética e harmonia facial.

Na cavidade anoftálmica embora a prótese ocular encontre-se adequadamente adaptada, na maioria dos casos pode-se observar certo grau de “espaço morto”, entre sua superfície posterior e o fundo da cavidade. Com isso, a secreção lacrimal, muco e resíduos estagnados nesse espaço constituem excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano. Algumas evidências sugerem que a superfície do material pode ter influência sobre as interações com as bactérias. Além disso, a microbiota endógena conjuntival é a primeira suspeita quando se está pesquisando a causa de infecções oculares pós-traumáticas e pós-operatórias.

A adesão bacteriana a polímeros e a produção de biofilme depende de propriedades físico-químicas da superfície do material e da superfície bacteriana. Os estafilococos são considerados os mais importantes patógenos de infecções protéticas, contribuindo assim para a maioria das bacteremias hospitalares. Entre os microrganismos mais frequentemente isolados da cavidade anoftálmica, estão os *estafilococos coagulase-negativos*, cuja espécie mais prevalente é o *Staphylococcus*

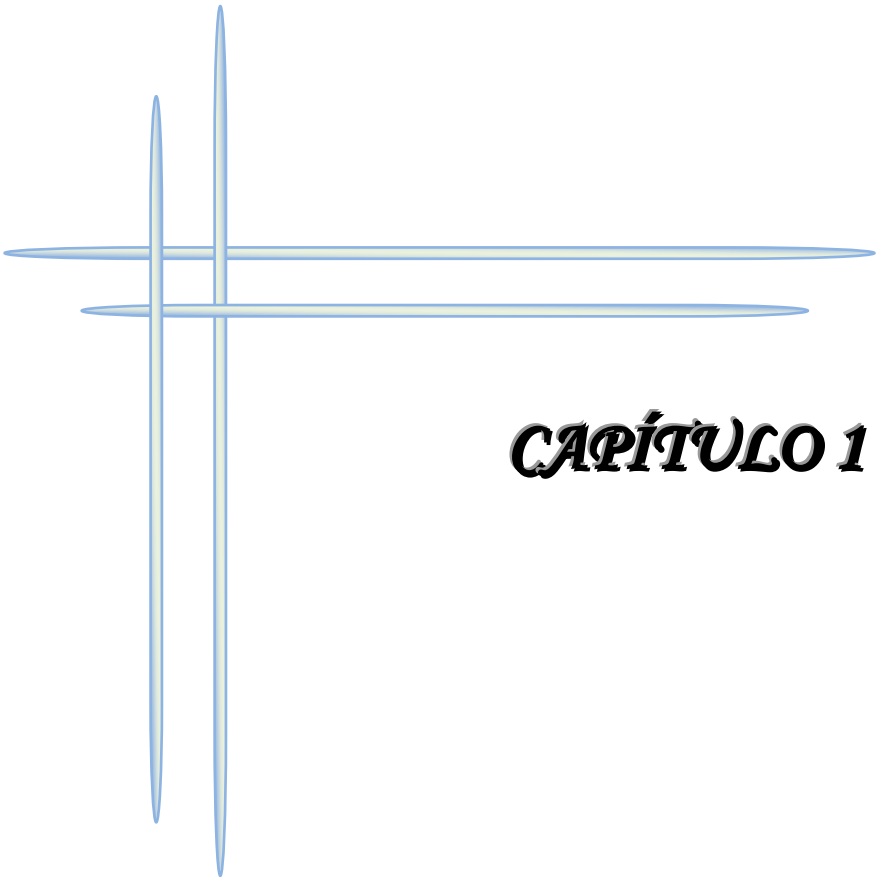
epidermidis; e o *estafilococos coagulase-positivos* cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus*. O *S. epidermidis* tem habilidade de se aderir e proliferar em superfícies de polímeros, especialmente lentes e próteses intra-oculares, secretando matriz extracelular viscosa (biofilme) que o protege contra antibióticos, bem como dos mecanismos de defesa do hospedeiro. O *S. aureus* vive principalmente nas superfícies das mucosas e tem sido considerado um dos mais versáteis e perigosos patógenos humanos. Assim para a manutenção da saúde dos usuários de prótese ocular, é importante ressaltar o controle da formação de biofilme microbiano sobre a resina acrílica.

Além disso, a literatura tem dirigido estudos em relação a variedade de técnicas de confecção do botão de íris artificial estético da prótese ocular. É conhecido que entre as técnicas de confecção do botão de íris artificial estão a pintura convencional e mistura de monômero-polímero sobre a íris artificial, a técnica da pintura invertida com a utilização de calotas pré-fabricadas e, também, a reprodução impressa ou fotográfica da íris sã do paciente, associada a mistura de monômero-polímero ou a calotas pré-fabricadas. Segundo a literatura, a utilização de calotas pré-fabricadas confere à prótese ocular propriedades físicas semelhantes à utilização da resina acrílica incolor em mistura monômero-polímero.

A pintura da íris artificial é o passo mais delicado e requer método e disciplina rigorosos, para que o resultado seja satisfatório. Portanto, deve-se considerar, durante a pintura, a qualidade da tinta utilizada e as diferenças entre as técnicas de obtenção do botão da íris artificial. Estes fatores são importantes, a fim de prevenir descoramento, manchas e alteração de cor diante dos procedimentos de envelhecimento, limpeza e manuseio da prótese pelo paciente. O botão de íris artificial pode sofrer alterações de cor ao longo do tempo, sendo essas alterações clinicamente observadas e, às vezes, quase imperceptíveis a olho nu; no entanto, elas podem vir a se tornar acentuadas, o suficiente para levar a indicação da confecção de nova prótese, mesmo quando a outra ainda apresenta boa adaptação.

Em relação às tintas utilizadas na confecção da pintura de íris artificiais, existem as tintas aquarela, guache, tinta a óleo, automotiva e tinta para modelismo, em diferentes superfícies, como papel, discos de acetato e resina acrílica. Alguns estudos demonstram que as tintas guache e acrílica, quando empregadas, apresentam alteração de cor, e a tinta a óleo apresenta melhor estabilidade de cor frente à ação degradante dos agentes ambientais. Além disso, a instabilidade de cor pode variar em relação à tonalidade do pigmento utilizado. Os pigmentos escuros apresentam maior resistência aos efeitos degradantes, devido à formação de ligações químicas mais estáveis, não sujeitas à quebra durante a polimerização.

Entre as soluções empregadas para a limpeza das próteses oculares, estão o sabão neutro, gluconato de clorexidina e solução multipropósito para lentes de contato. No entanto, verifica-se que não há estudos quanto ao efeito de soluções desinfetantes e tempo de uso no controle de biofilmes formados sobre resina acrílica específica para prótese ocular, bem como sobre a alteração de cor do botão estético de íris artificial diante das diferentes possibilidades de sua confecção.



CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO QUÍMICA NA REMOÇÃO DO BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS SPP* EM SUPERFÍCIE DE RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR

2.1 RESUMO

A desinfecção de próteses oculares objetiva o controle da formação de biofilme, e prevenção de inflamação e infecção na microbiota endógena conjuntival, associada com *Staphylococcus* spp. O desenvolvimento de biofilme na prótese ocular pode promover bacteremia recorrente, e resistência a antibióticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de tratamentos desinfetantes na remoção de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, desenvolvidas na superfície da resina acrílica específica para prótese ocular. Para isso, 396 amostras em resina acrílica N1 foram confeccionadas (1,0 cm em diâmetro e 0,3 cm em espessura) sendo metade dessas amostras para formação de biofilme de *S. epidermidis* e a outra metade para formação de biofilme de *S. aureus*, ambos na superfície da amostra. Para cada cepa bacterina, 66 amostras foram submetidas a formação de biofilme em sua superfície durante três diferentes tempos: inicial (24h), intermediário (48h) e maduro (72h). Em seguida as amostras foram distribuídas aleatoriamente (unidade amostral n=6) para um dos tratamentos desinfetantes: água destilada durante 10, 15, 30 min e 6 h (controle-CTL); sabão neutro (NES) durante 30 min; Opti-

Obs.: Estudo realizado na University of Tennessee, USA – Bolsa BEPE- FAPESP

Free® (OPF) durante 30 min e 6 h; Efferdent® (EFF) durante 15 min; e gluconato de clorexidina (0,5%; 2% e 4%) (CHX) durante 10 min. Após o tratamento desinfetante, as amostras acrílicas foram imediatamente agitadas para desprendimento do biofilme. A contagem de colônias foi verificada por análise do número de UFC/mL. Os resultados foram analisados por ANOVA três-fatores e teste de Tukey (α=0,05). Os tratamentos com CHX e EFF apresentaram menores valores de UFCs, estatisticamente significante (*P*<0,0001), em relação aos seus respectivos grupos controle para ambas as bactérias em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme. Apenas para *S. aureus* o tratamento com OPF durante 6 h apresentou menores valores, estatisticamente significantes, em relação ao grupo controle. Entretanto, não foi observada diferença significante (*P*> 0,05) entre os demais tratamentos e os grupos controle para ambas as cepas em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme. Pode ser concluído que os desinfetantes com peróxido alcalino e gluconato de clorexidina apresentaram efeito antimicrobiano de amplo espectro na remoção do biofilme de *Staphylococcus* spp. na superfície de resina acrílica específica para prótese ocular.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme. Staphylococcus epidermidis. Staphylococcus aureus. Desinfecção. Polimetil Metacrilato (PMMA). Olho artificial.

2.2 INTRODUÇÃO

A prótese ocular é uma modalidade da prótese facial[1] que visa reparar aloplasicamente as perdas ou as deformidades do bulbo ocular[2]. Uma vez que a visão não pode ser reconstituída por meios artificiais, a prótese tem como principal objetivo reconstruir a estética da face, restaurando e embelezando o rosto cuja expressão fora comprometida. Atualmente o material de escolha para a reabilitação ocular são as resinas acrílicas por apresentarem características singulares como baixo custo, boa adaptação e biocompatibilidade, fácil manipulação e estética satisfatória[3].

Na cavidade anoftálmica embora a prótese ocular encontre-se adequadamente adaptada, na maioria dos casos pode-se observar certo grau de “espaço morto”, entre a superfície posterior da mesma e o fundo da cavidade[4,5]. Com isso, a secreção lacrimal, muco e resíduos estagnados nesse espaço constituem excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano[5]. A acumulação de tais secreções para dentro da cavidade anoftálmica pode promover alterações estéticas aos pacientes, bem como desconforto e inflamação.

É conhecido que as bactérias colonizam superfícies artificiais extremamente bem[6]. A formação de biofilmes na superfície de materiais poliméricos (por exemplo, resina acrílica - polimetilmetacrilato - PMMA) ocorre através da absorção de glicoproteínas pela resina formando a

película adquirida, com subsequente colonização bacteriana à superfície da mesma[6]. A microbiota endógena conjuntival é a primeira suspeita quando se está pesquisando a causa de infecções oculares pós-traumáticas e pós-operatórias[7]. Ainda a maior parte das infecões protéticas é causada por estafilococos[8]. Assim, podemos encontrar como os mais frequente patógenos colonizadores da cavidade anoftálmica os *estafilococos coagulase-negativos*, cuja espécie mais prevalente é o *Staphylococcus epidermidis;* e o estafilococos *coagulase-positivos* cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus*[9].

Assim o controle da formação de biofilme microbiano para a manutenção da saúde dos usuários de prótese ocular, é muito importante. Este controle do biofilme pode ser realizado por meio de técnicas diárias de higienização e desinfecção das próteses[10-12]. Algumas soluções utilizadas para a limpeza das próteses oculares, são o sabão neutro, gluconato de clorexidina e solução multipropósito para lentes de contato[12]. Contudo na literatura são escassos os estudos relacionados a avaliação da eficácia de soluções desinfetantes no controle de biofilmes formados sobre resina acrílica para prótese ocular.

---

* Artigo será formatado segundo normas da Revista *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (Anexo A)

2.3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de diferentes tratamentos com soluções desinfetantes na remoção do biofilme de *Staphylococcus* spp., desenvolvido em superfície de resina acrílica específica para prótese ocular. A hipótese do estudo é que os tratamentos com soluções de Opti-Free Express® e clorexidina a 4% podem apresentar melhor desempenho na redução da adesão bacteriana (ou limitante do crescimento de biofilme) em relação a tratamentos com outras soluções, devido a sua eficácia antibacteriana conhecida na literatura.

2.4 MATERIAL E MÉTODO

Foram confeccionadas 396 amostras em resina acrílica específica para prótese ocular N1 (cor branca) de esclera artificial (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil), sendo metade dessas amostras para formação de biofilme de *S. epidermidis* e a outra metade para formação de biofilme de *S. aureus*, ambos na superfície da amostra. Para cada cepa, 66 amostras foram submetidas a formação de biofilme em sua superfície durante três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Em seguida as amostras foram distribuídas (unidade amostral n=6) de acordo com tratamento desinfetante realizado pelas soluções apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Soluções desinfetantes utilizadas no estudo.

Produto	Cor	Fabricante	Composição Química
Sabão neutro	Incolor	Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil	Glicerina, polietileno glicol laurato de sorbitano, sulfato de éter de tridecilo de sódio, cocoamidopropil-betaína, cocoanfocarboxiglicinato, álcool cetílico etoxilado e propoxilado, poliglucose lauril, lanolina etoxilados, éter de laurilo de sódio carboxilato, diestearato de polietileno-glicol, fragrâncias, metilisotiazolinona e ethylchloroisothiazolinone, tetrassódio de EDTA ácido cítrico, corante vermelho alimentar 1 e água. Fórmula biodegradável
Opti-Free® Express® solução mutipropósito	Incolor	Alcon, Fort Worth, TX, EUA	Solução tamponada estéril, isotônica, aquosa, contendo citrato de sódio, cloreto de sódio, ácido bórico, sorbitol, aminometilpropanol TETRONIC ® 1304, com edetato dissódico a 0,05%, Polyquad ® poliquatérnio-1) a 0,001% e ALDOX ® (dimetilamina miristamidopropil) 0,0005%
Efferdent Original Denture Cleanser	Azul	Pfizer Consumer Health, Morris Plains, NJ, EUA	Peróxido Alcalino
Gluconato de Clorexidina	Incolor	Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA	1,1 '-hexametileno-bis [5 - (p-clorofenil) biguanida] di-D-gluconato) em base contendo água, álcool, glicerina, PEG-40 sorbitano diisoestearato, sabor, sacarina de sódio, e FD & C Azul No. 1. O produto gluconato de clorexidina é uma solução neutra (taxa de pH de 5-7)

Confecção das amostras em resina acrílica

Para a padronização das amostras em resina acrílica, foi utilizada uma matriz metálica vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada. As suas dimensões internas corresponderam às medidas da futura amostra[13]. Esta matriz foi posicionada sobre uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) e seu interior foi preenchido com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. E Com. Ltda, Cotia, SP, Brasil).

Em seguida o conjunto lâmina de vidro e matriz metálica foi incluído em mufla própria para polimerização em forno microondas (VIPI STG; VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltd, Pirassununga, SP, Brasil). Para isso, a superfície interna da base da mufla foi isolada com vaselina em pasta, sendo preenchida em seguida com gesso especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind e Com Ltd, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), seguindo a proporção de 30 mL de água para 100 g de pó, espatulado por 1 minuto e vertido sob vibração constante de acordo com o fabricante.

Após a cristalização do gesso, outra lâmina de vidro com as mesmas dimensões citadas anteriormente foi posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com cera utilidade. A contra-mufla foi posicionada e sobre a superfície desta última lamina de vidro foi vertido gesso especial tipo IV. Em seguida a mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH; Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, SP, Brasil)

sobre pressão constante de 1,2Kg/F por 2 minutos[3,10]. Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a cera removida do interior de cada superfície interna da matriz. A superfície do vidro foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil).

A resina acrílica termopolimerizável N1 (cor branca) para esclera artificial (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra, 0,7 mL de monômero (líquido) foram misturados com 2,1 g de polímero (pó), para ser manipulado e ao atingir a fase plástica inserido no interior das superfícies internas da matriz incluída em mufla. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada a prensa hidráulica (Midas Dental Products Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com força de 1,2Kg/F, durante 2 minutos, e realizada a polimerização de bancada por 30 minutos. A resina foi polimerizada por energia de microondas (BC 30 LTS Maxi; Brastemp, São Paulo, SP, Brasil) com 1200W de potência durante 10 minutos (3 min iniciais com 30% da potência total, 4 min sem potência (0%), e 3 min com 60% da potência total)[10]. Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta e as amostras de resina acrílica foram removidas.

As superfícies das amostras foram submetidas ao polimento, utilizando-se lixas metalográficas (#120) em politriz automática (Ecomet 300PRO; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). De acordo com Yamauchi[14] a

adesão bacteriana *in vitro* foi verificada por meio de uma rugosidade da superfície limite de 0,09. Assim, este processo foi feito capaz de facilitar à adesão bacteriana à superfície do acrílico[10,14]. Em seguida, as amostras foram armazenadas em água destilada deionizada a 37ºC durante 48 horas, a fim de libertar o monômero residual[10]. Posteriormente as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Arotec, Odontobrás, São Paulo, SP, Brasil) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem (Figura 1).

Figura 1. Amostras finalizadas.

Para a caracterização das imperfeições de superfície, uma amostra aleatoriamente selecionada foi submetida a Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)[15] (JSM 610LA; JEOL, Tóquio, Japão) imediatamente após a limpeza ultra-sônica. As imagens da amostra foram obtidas nos aumentos de 300 e 10.000 vezes. A análise química elementar em

volumes pequenos da resina acrílica utilizada, da ordem de 1 μm^3 (micrômetro cúbico), foi verificada pela técnica de EDS[15]. A energia de superfície foi calculada, em dez amostras aleatoriamente selecionadas, por meio de um goniômetro (Ramé-Hart 100-00; Ramé-Hart Instrument Co., Alemanha) usando o método da gota séssil. Desta forma dez leituras foram realizadas em cada amostra para mensurar o ângulo de contato da água (componente polar), e outras 10 leituras foram novamente realizadas em cada amostra para mensurar o ângulo de contato do diodometano (componente dispersivo). O ângulo de contato foi calculado pela equação de Young: $\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta_C$; onde θ_C é o ângulo de contato e γ a energia de superfície das interfaces: sólido-vapor (sv), sólido-líquido (sl), e líquido-vapor (lv). A relação do ângulo de contato e energia de superfície foram determinadas pelo método de Owens-Wendt, baseado no ângulo de contato formado por 2 líquidos com diferentes polaridades.

Posteriormente, as amostras foram aleatoriamente distribuídas aos grupos de ensaio experimental de acordo com o tratamento desinfetante, e em seguida esterilizadas por óxido de etileno para eliminação de possíveis microrganismos remanescentes[16].

Inoculação e condições de crescimento

As cepas de *S. epidermidis* (ATCC 35984 - biofilme positiva) e as cepas de *S. aureus* (ATCC 6538 – biofilme positiva) foram utilizadas no

estudo. Para o preparo do inócuo as células foram mantidas em -70°C em solução contendo 25% de glicerol e semeadas em placas contendo meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth Agar -TSB) (Becton Dickinson and Company, NJ, EUA) incubadas a 37°C. A cultura foi iniciada em 5 mL de BHI (Brain Heart Infusion Broth - BHI) (Becton Dickinson and Company, NJ, EUA) e mantidas em crescimento a 37°C por 18 horas (toda a noite) a fim de obter células em fase exponencial[8]. Após este período a densidade óptica foi mensurada por espectrofotômetro a fim de estabelecer a concentração de 0,01 a OD600. A quantidade de cultura inoculada foi calculada para obter aprox. 1×10^8 UFC/mL.

Desenvolvimento do biofilme

As amostras de resina acrílica foram retiradas do envelope de esterilização com auxílio de uma pinça esterilizada e colocadas em placas de cultura de seis poços contendo 6 mL de TSB (Tryptic Soy sem dextrose) suplementado com 1% de glucose (Becton Dickinson and Company, NJ, EUA). Em seguida foi adicionado ao meio de cultura o inócuo de *S. epidermidis* ou *S. aureus* com aprox. 10^8 cells/mL[8]. As amostras foram mantidas a 37°C com agitação de 100 rpm (modelo C24; Incubator Shaker; Edison, NJ, EUA). Foram examinadas três fases de crescimento de biofilme: inicial (24 horas), intermediária (48 horas), e madura (72 horas)[17] (Figura 2). A cada 24 horas, as amostras foram removidas com pinça estéril e lavadas duas vezes com 6 mL de PBS para

remover as células fracamente aderidas. Após isso, as amostras foram colocadas em uma nova placa de seis poços com novo meio de cultura.

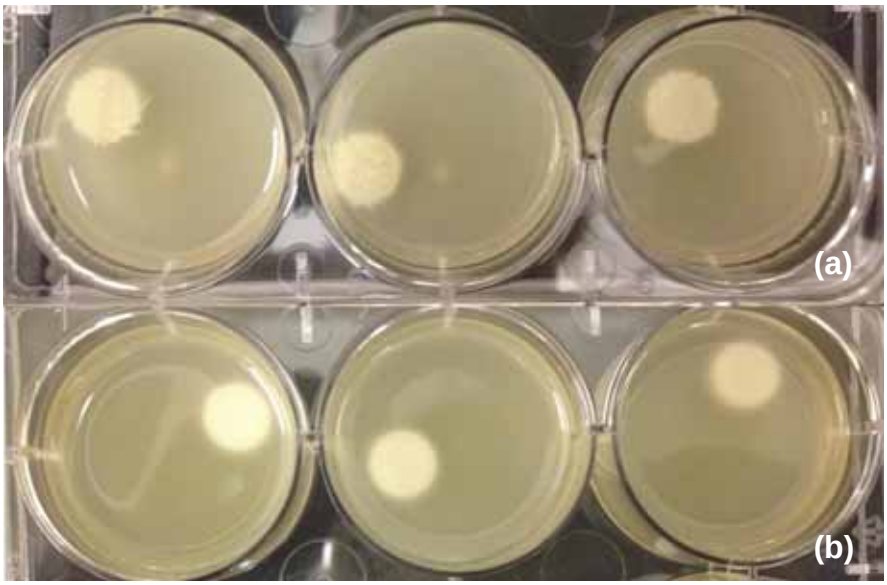


Figura 2. Amostras imersas no meio de cultura inoculado com *S. epidermidis* após 72 horas de desenvolvimento do biofilme (a), e amostras imersas no meio de cultura inoculado com *S. aureus* após 72 horas de desenvolvimento do biofilme (b).

Tratamento das amostras pelas soluções desinfetantes

Os tratamentos de desinfeção foram realizados por imersão em soluções desinfetantes: água destilada estéril por 10, 15, 30 minutos, e 6 horas (controle-CLT); sabão neutro (NES) por 30 minutos; Opti-Free Express® solução multipropósito (OPF) por 30 minutos, e 6 horas; água destilada estéril a 37ºC contendo uma pastilha de Efferdent Original Denture Cleanser (EFF) por 15 minutos[18]; e gluconato de clorexidina

(CHX) a 0,5%; 2% e 4% por 10 minutos[19] (Tabela 1). Após cada período de incubação (24, 48 e 72 horas)[17], as amostras acrílicas foram imediatamente desinfetadas. O tratamento de desinfecção foi efetuado no interior da câmara de fluxo, retirando as amostras da placa de seis poços e imergindo-os, individualmente em 5 mL de cada substância desinfetante para posteriormente, lavá-los em 6 mL de PBS durante 15 segundos[10]. A solução de gluconato de clorexidina foi manipulada no mesmo dia do experimento, para garantir que sua concentração desejada se mantivesse estável.

Contagem das células do biofilme imediatamente após desinfecção

Após os tratamentos com as soluções desinfetantes e lavagem em PBS, as amostras foram imersas em 1 mL de PBS e agitadas para desagregar a estrutura do biofilme formada em sua superfície por vortex[20] três vezes, durante 1 minuto cada vez, em ambiente de 4°C (os tubos repousaram no gelo durante 2 minutos entre cada agitação). Em seguida as amostras foram removidas dos tubos permanecendo somente as soluções, as quais foram diluídas e pleiteadas em triplicata no BHI ágar. As placas Petri foram incubadas a 37°C em condições aeróbicas por 24 horas. O número de colônias formadas por mililitro (UFC/mL)[18] foi contado utilizando contador de colônias (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Análise Estatística

A transformação Box-Cox[21] foi utilizada nos resultados para obtenção de dados normais e homocedasticidade. A transformação indicou que a função logarítmica natural (ln) aplicada aos dados atende aos pressupostos da Análise de Variância (ANOVA). A ANOVA três-fatores foi realizada para verificar diferença significante entre os fatores analisados: cepa, tratamentos desinfetantes e períodos. As diferenças significantes nos valores obtidos na ANOVA foram comparados por teste de Tukey-Kramer HSD em nível de significância de 0,05. Além disso, *Box plots* foram realizados para apresentar a distribuição e variabilidade dos resultados.

2.5 RESULTADOS

A MEV revelou rugosidade de superfície na resina acrílica e a análise EDS apresentou altos níveis de carbono (C) e baixos níveis de oxigênio (O_2) (Figura 3). Os valores médios (DPs) da energia de superfície das amostras avaliadas foram (em ângulo) 29,26 (2,95). Os componentes dispersivos apresentaram maiores valores médios de ângulo quando comparados com os componentes polares, respectivamente (28,86 (2,46); 0,12 (0,11)). As imagens do ângulo de contato indicaram alto ângulo de contato da superfície da amostra com a água (aprox. 113 graus) após polimento (#120) (Figura 3).

Pode-se verificar de forma geral maior número de UFCs, estatisticamente significante (P<0,0001) para *S. epidermidis*, e maiores valores para os respectivos quartis, quando comparada com *S. aureus* (Tabela 2, Figura 5). Em relação ao período, independente do tipo de bactéria e tratamento, pode-se verificar aumento do número de UFCs, estatisticamente significante, ao longo do tempo (P<0,0001). (Tabela 2, Figura 5). Em particular pode-se observar que o primeiro quartil no período de 72 h foi superior aos demais quartis relativos aos outros períodos (Figura 5). Pela distribuição dos dados, considerando o tipo de bactéria e período, pode-se verificar que as amostras tratadas com CHX e EFF apresentaram menor número de UFCs, estatisticamente significante (P<0,0001), comparado aos seus grupos controles (Tabela 2, Figura 4).

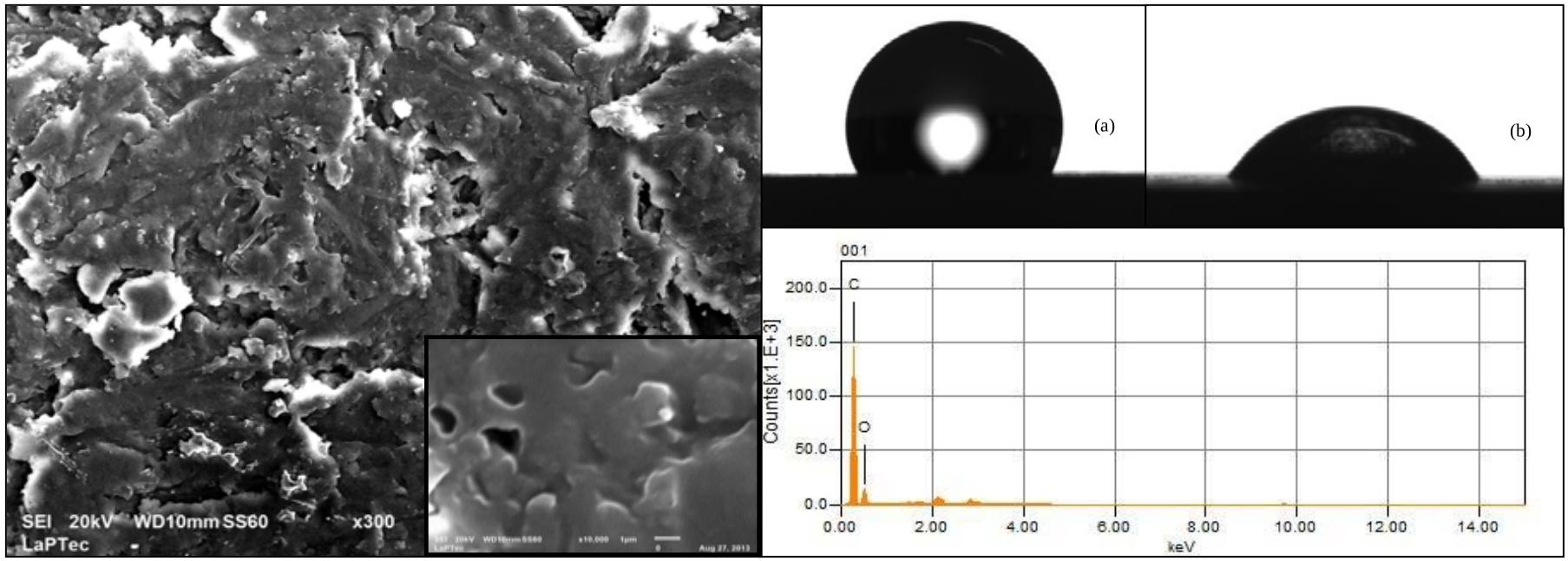


Figura 3. Imagens da MEV (×300 e 10.000 vezes); ângulo de contato formado com a água (a) e o diodo metano (b); e análise EDS da resina acrílica imediatamente após polimento (#120) e previamente a esterilização. O ângulo de contato da gota, com a superfície de resina acrílica foi de 113 e 60 graus, respectivamente.

Tabela 2. Resultados de ANOVA três fatores para ln (número de células aderidas/mL).

Fatores de Variação	***gl***	**SQ**	**QM**	**Valor de F**	**Valor de *P***
Bactéria	1	442,2	442,2	1623,1	< 0,0001*
Tratamento desinfetante	10	15500,7	1550,1	5689,9	< 0,0001*
Período	2	1823,4	911,7	3346,5	< 0,0001*
Bactéria x Tratamento desinfetante	10	267,9	26,8	98,3	< 0,0001*
Bactéria x Período	2	23,9	11,9	43,8	< 0,0001*
Bactéria x Tratamento desinfetante x Período	20	646,2	32,3	118,6	< 0,0001*
Erro	330	89,9	0,3		
Total	395	19020,4			

**P* < 0,05 denota diferença estatística significante.

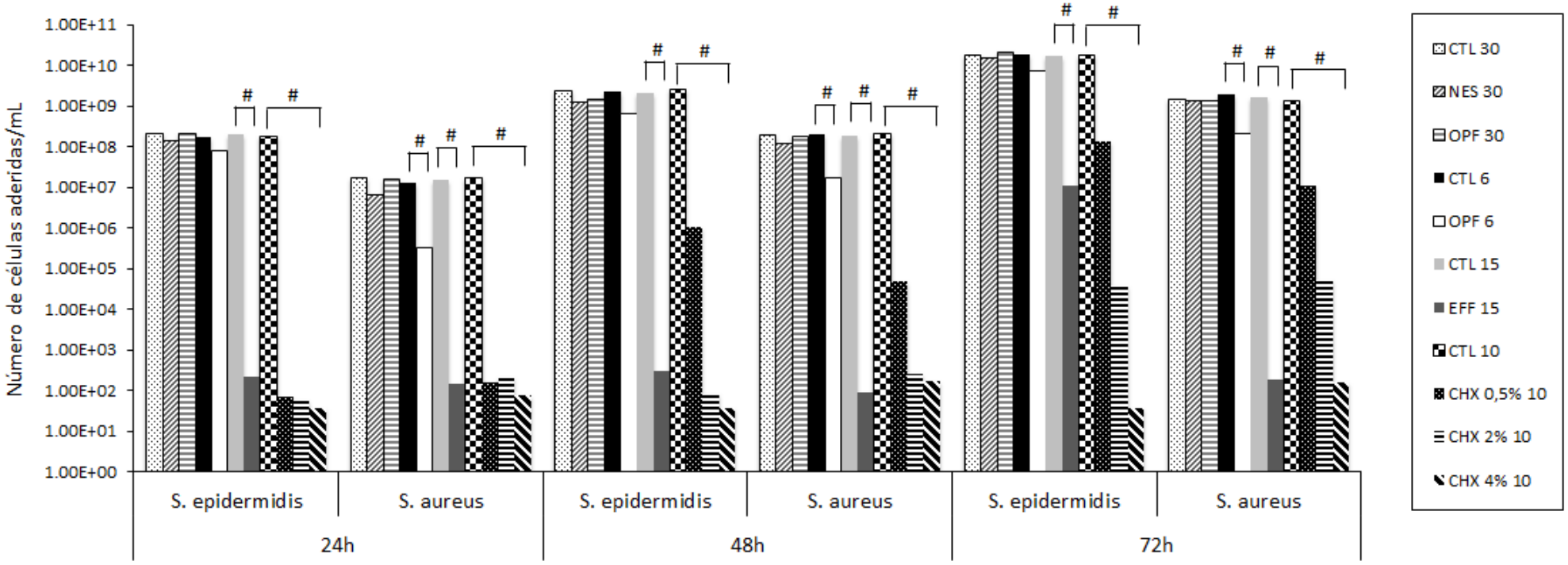


Figura 4. Número de células aderidas de *S. epidermidis* ATCC35984 e *S. aureus* ATCC6538 por mL para cada tratamento desinfetante e período de desenvolvimento do biofilme. # Diferença entre tratamentos e controle ($P < 0,05$ ANOVA).

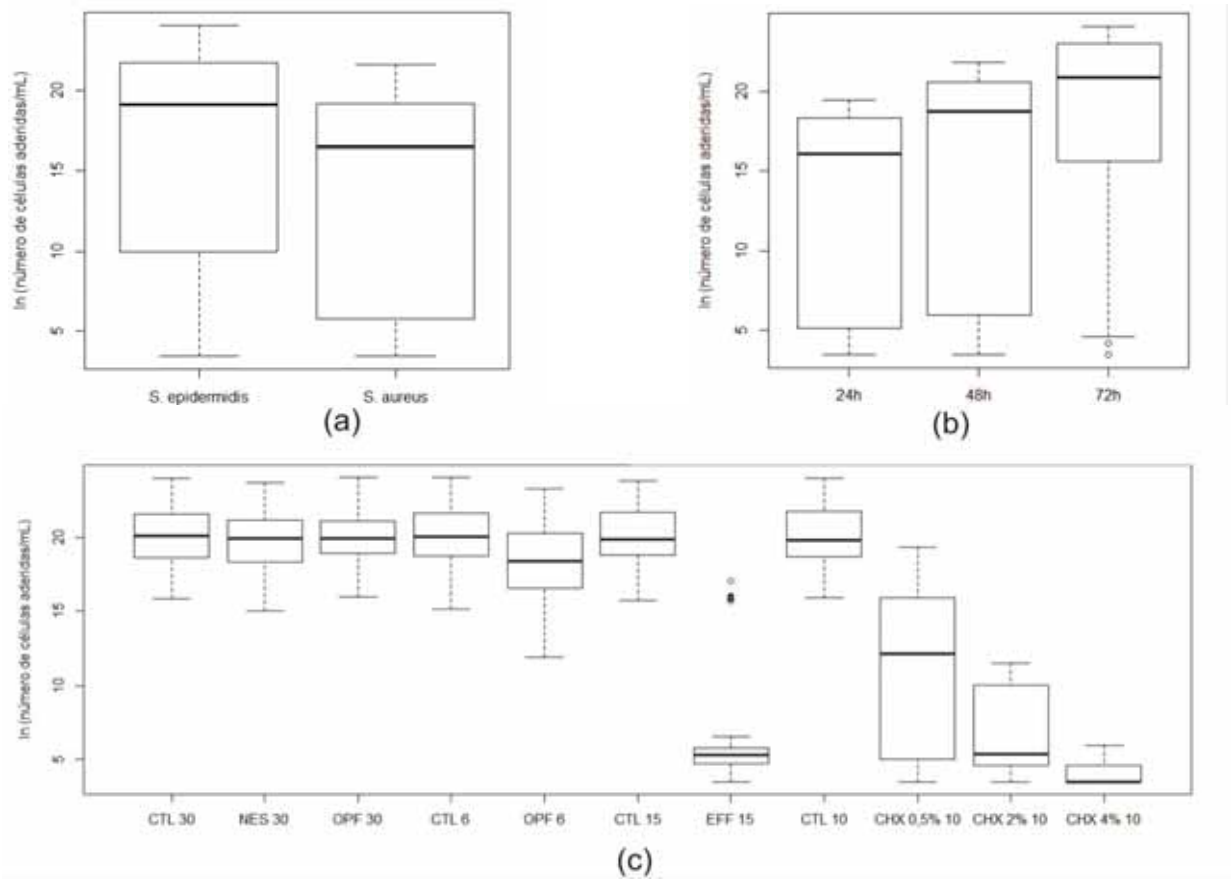


Figura 5. Distribuição do ln (número de células aderidas/mL) para tipo de bactéria (a); período (b) e tratamento desinfetante (c).

Além disso, pode-se observar que os valores dos quartis das amostras tratadas com CHX e EFF, apresentaram-se menores em relação aos demais tratamentos (Figura 5). É importante ressaltar que o tratamento com CHX a 4% durante 10 min apresentou amplo espectro antimicrobiano, contra o *Staphylococcus spp*. em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme; desde que um número extremamente baixo de UFCs, estatisticamente significante (P<0,0001), foi observado para ambas as cepas (Tabela 2 e Figuras 4-5).

As amostras tratadas com OPF durante 6 h para *S. aureus* apresentaram menor número de UFCs, estatisticamente significante (P<0,001), quando comparado com as amostras do grupo controle, em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme (Tabela 2 e Figura 5). Enquanto para o *S. epidermidis*, as amostras tratadas com OPT durante 6 h apresentaram menor número de UFCs, sem diferença estatística significante (P>0,05), quando comparado ao grupo controle (Tabela 2 e Figura 5). Além disso, não houve diferença estatisticamente significante (P>0,05), quanto ao número de UFCs das amostras tratadas com NES e OPF, sendo ambos os tratamentos durante 30 min para *Staphylococcus spp.* em relação aos seus respectivos grupos controles (Tabela 2 e Figura 5).

2.6 DISCUSSÃO

A hipótese deste estudo de que o efeito dos tratamentos desinfetantes com CHX e OPF poderiam ser limitantes na redução da adesão bacteriana em relação aos outros tratamento foi confirmado pelo fato de que houve diferenças significativas em relação aos seus respectivos grupos controles. O modelo de crescimento bacteriano utilizado deste estudo simulou *in vitro* as condições do crescimento estático do biofilme que se encontram na superfície de contato de uma prótese ocular com o tecido da membrana conjuntiva.

A característica de rugosidade de superfície da resina acrílica, consequentemente, modifica a interação molecular do material com o microrganismo. Superfícies lisas e altamente polidas geralmente são mais estéticas e de mais fácil manutenção em comparação com superfícies rugosas[22]. A presença de irregularidades e rugosidade elevada ainda funciona como abrigo microbiano, aumentando a probabilidade de estes microrganismos permanecerem nas superfícies mesmo depois de serem limpas[22,23]. Com isso, a rugosidade de superfície proporcionada pelo polimento das amostras de resina acrílica neste estudo pode ter determinado maior capacidade do biofilme para fazer o íntimo contato com o substrato do polímero (Figura 3). De acordo com Quirynen[23] , uma rugosidade de superfície maior do que o limite de 0,2 µm parecem ter um efeito significativo, para adesão microbiana. No entanto, é importante

ressaltar que a resina acrílica utilizada neste estudo apresentou comportamento hidrofóbico, embora tenha apresentado componentes polares em sua mensuração de energia de superfície (Figura 3). As amostras de resina acrílica apresentaram-se favoráveis para o desenvolvimento de biofilme, uma vez que foi encontrado elevado número de adesão bacteriana nos grupos de tratamento controle. (Tabela 2). Este fato pode ser explicado pelas características de rugosidade superficial e presença de componentes polares no material. Alguns estudos têm sugerido que as superfícies hidrofílicas, dotadas de componentes polares, são mais propensas a adesão de patógenos[24,25]. Além disso, no presente estudo, pode-se observar maior número de UFCs de *S. epidermidis*, com diferença significante (P<0,0001), de adesão para a resina acrílica em relação ao *S. aureus* (Tabela 2, Figuras 4-5). Estes resultados podem ser devido a diferenças entre as cepas bacterianas, fase de crescimento e meio de cultura[26]. É conhecido que a aderência do *S. epidermidis*, vem pela sua capacidade de aderir e formar espessa matriz extracelular com múltiplas camadas sobre a superfície de polímeros[27]. Ainda assim estudos *in vitro* mostram que o *S. epidermidis* adere preferencialmente à superfície de polímeros, enquanto o *S. aureus* à superfície metálica[28].

Em relação a contagem de células de biofilme para *S. aureus*, pode-se observar que as amostras tratadas com OPT durante 6 h e EFF durante 15 min, apresentaram menores valores de UFCs, estatisticamente significante (P<0,001; Tabela 2; Figura 4), quando comparadas com os

respectivos grupo controle, em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme. Nossos resultados vem corroborar com outros estudos onde o biofilme produzido por *S. aureus* também foi reduzido ou eliminado com tratamentos similares.[29,30] A ação de um desinfetante contra microrganismos em biofilmes pode variar no tempo e no espaço. É conhecido que os componentes de desinfecção como compostos de amônio quaternário (QAC) e miristamidopropil dimetilamina atuam primariamente nas células próximas à interface do fluido do biofilme e progressivamente penetram e atuam nas células mais profundas[29,30]. O Polyquad (polyquaternium-1, PQ-1) pode causar prejuízos a membrana citoplasmática do *S. aureus*[31]. Quanto aos peróxidos alcalinos, estes apresentam em sua composição agentes oxidantes, efervescentes, redutores da tensão superficial e quelantes[32]. A maioria dos produtos comerciais são apresentados na forma de pós ou tabletes, os quais, em contato com a água, tornam-se soluções produzindo dióxido de carbono ou oxigênio. Estudos anteriores confirmaram a capacidade destes produtos de promover a desagregação da estrutura do biofilme, durante ação efervescente[32,33].

As amostras tratadas com OPT durante 6 h, embora apresentaram menores valores de UFCs para *S. epidermidis*, não tiveram diferença estatistica significante, em relação ao grupo controle (P>0,05) para todos os períodos de desenvolvimento do biofilme (Tabela 2; Figura 5). De acordo com Davison et al.[34] o QAC apenas retardam a penetração do

biofilme na superfície do material. Essas diferenças encontradas em nosso estudo de um mesmo tratamento para duas diferentes bactérias pode ser devido aos métodos para a detecção de formação de biofilme[35]. Além disso, os microganismos bacterianos incluindo *S. epidermidis* possuem alguns componentes em sua matriz de biofilme como o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), o qual é constituído por polissacárido sulfatado. Isso permite que outras bactérias possam se ligar ao biofilme já existente, gerando um biofilme de multicamadas e resistente[36]. Ainda, a estruturação do biofilme do *S. epidermidis* e seu desprendimento ainda são mal compreendidos[36].

Quanto ao tratamento com CHX, pode-se verificar que a concentração a 4% acarretou em menores valores de UFCs, estatisticamente significante (P<0,001), para *Staphylococcus* spp. em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme das amostras tratadas. A clorexidina é um composto sintético derivado a partir de uma bis-biguanida com um elevado nível de atividade antimicrobiana[37,38]. Devido a este nível de atividade, pequenas concentrações de sais de clorexidina, são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou exterminar espécies bacterianas. Em nosso estudo, o tratamento com CHX durante 10 min foi ativo em concentrações baixas (0,5 % , 2 %, 4 %) contra um número de bactérias gram-positivas aeróbias (Tabela 2, Figuras 4-5). No entanto, esta solução desinfetante não foi capaz de remover completamente o biofilme bacteriano. É conhecido que a ação do

gluconato de clorexidina é de rápida absorção pelas células bacterianas, o que resulta em uma série de modificações na permeabilidade citológica e propriedades ópticas destes patógenos. Estudos anteriores verificaram que a clorexidina reagiu com grupos lipofílicos de células de microrganismos e provocou desorientação da lipoproteína de membrana dificultando o funcionamento da barreira osmótica[39,40]. No entanto a partir da reação inicial, os eventos subsequentes dependem da concentração da substância[38]. Por esta razão, em nosso estudo, as concentrações mais baixas de clorexidina apresentaram-se menos eficazes contra as bactérias gram-positivas nos últimos períodos de desenvolvimento de biofilme.

Embora resultados satisfatórios foram encontrados para o tratamento CHX na redução bacteriana de *Staphiloccocus* spp., a literatura científica tem mostrado que este produto apresenta o potencial de alterar algumas propriedades físicas e mecânicas dos polímeros utilizados na confecção de peças protéticas. Assim, a clorexidina pode não ser mais apropriada para o uso diário de desinfecção da prótese ocular. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar diferentes concentrações e imersão por um longo período. O principal objetivo da imersão de uma prótese ocular, em uma solução desinfetante é a remoção do biofilme e descontaminação da superfície, uma vez que a prótese pode funcionar como reservatório de agentes patógenos. Assim, um dos objetivos mais importantes de um protocolo de desinfecção da

prótese é evitar a formação de biofilme na cavidade anoftálmica. No presente estudo, o tratamento com CHX a 4% durante 10 min foi eficiente para remover a formação de biofilme no período de 72 horas, sem diferença significativa entre as espécies de *Staphylococcus* spp. Embora este estudo não reproduz completamente o ambiente ocular, esses resultados podem sugerir a necessidade de estimular um protocolo periódico de desinfecção da prótese ocular.

2.7 CONCLUSÃO

- ✓ Os desinfetantes com peróxido alcalino e gluconato de clorexidina apresentaram efeito antimicrobiano de amplo espectro na remoção do biofilme de *Staphylococcus* spp. na superfície de resina acrílica específica para prótese ocular.
- ✓ A desinfecção com Opti-Free foi eficaz na redução de adesão a superfície das amostras, apenas para o *S. aureus* em todos os períodos de desenvolvimento do biofilme.

2.8 REFERÊNCIAS

1. Goiato MC, Santos DM, Bannwart LC, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF, Santos EG. Psychosocial impact on anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. Int J Oral Maxillofac Surg 2013;42(1):113-9.
2. Fernandes AU, Goiato MC, Dos Santos DM. Effect of weathering and thickness on roughness of acrylic resin and ocular button. Cont Lens Anterior Eye 2010;33(3):124-7.
3. Bannwart LC, Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF, Andreotti AM, de Medeiros RA. Chromatic changes to artificial irises produced using different techniques. J Biomed Opt 2013;18(5):58002.
4. Kim JH1, Lee MJ, Choung HK, Kim NJ, Hwang SW, Sung MS, Khwarg SI. Ophthal Plast Reconstr Surg. Conjunctival cytologic features in anophthalmic patients wearing an ocular prosthesis. 2008;24(4):290-5.
5. Vasquez RJ, Linberg JV. The anophthalmic socket and the prosthetic eye. A clinical and bacteriologic study. Ophthal Plast Reconstr Surg 1989;5(4):277-80.
6. Singh D, Kaur H, Gardner WG, Treen LB. Bacterial contamination of hospital pagers. Infect Control Hosp Epidemiol 2002;23(5):274-6.

7. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials 2012;33(26):5967-82.
8. Henriques M, Sousa C, Lira M, Elisabete M, Oliveira R, Oliveira R, Azeredo J. Adhesion of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis to silicone-hydrogel contact lenses. Optom Vis Sci 2005;82(6):446-50.
9. Gaál V, Kilár F, Acs B, Szijjártó Z, Kocsis B, Kustos I. In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. Colloids Surf B Biointerfaces 2005;45(3-4):125-30.
10. Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. Gerodontology 2013;30(1):32-9.
11. Goiato MC, dos Santos DM, Gennari-Filho H, Zavanelli AC, Dekon SF, Mancuso DN. Influence of investment, disinfection, and storage on the microhardness of ocular resins. J Prosthodont 2009;18(1):32-5.
12. Paranhos RM, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. J Appl Oral Sci 2007;15(1):33-8.

13. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. J Prosthodont 2012;21(1):7-15.
14. Yamauchi M, Yamamoto K, Wakabayashi M, Kawano J. Kawano. In vitro Adherence of Microorganisms to Denture Base Resin with Different Surface Texture. Dent Mater J 1990;9(1):19-24.
15. Goiato MC, Zuccolotti BCR, Santos DM, Sinhoreti MAC, Moreno A. Effect of intrinsic nanoparticle pigmentation on the color stability of denture base acrylic resins J Prosthet Dent 2013;110(2):101-6.
16. da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, Porto VC. Microscopical analysis of Candida albicans biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses 2011;54(6):e712-7.
17. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001;39(6):2151-6.
18. Vieira AP, Senna PM, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing Candida spp. biofilm recolonization on liner surface. Braz Oral Res 2010;24(3):342-8.

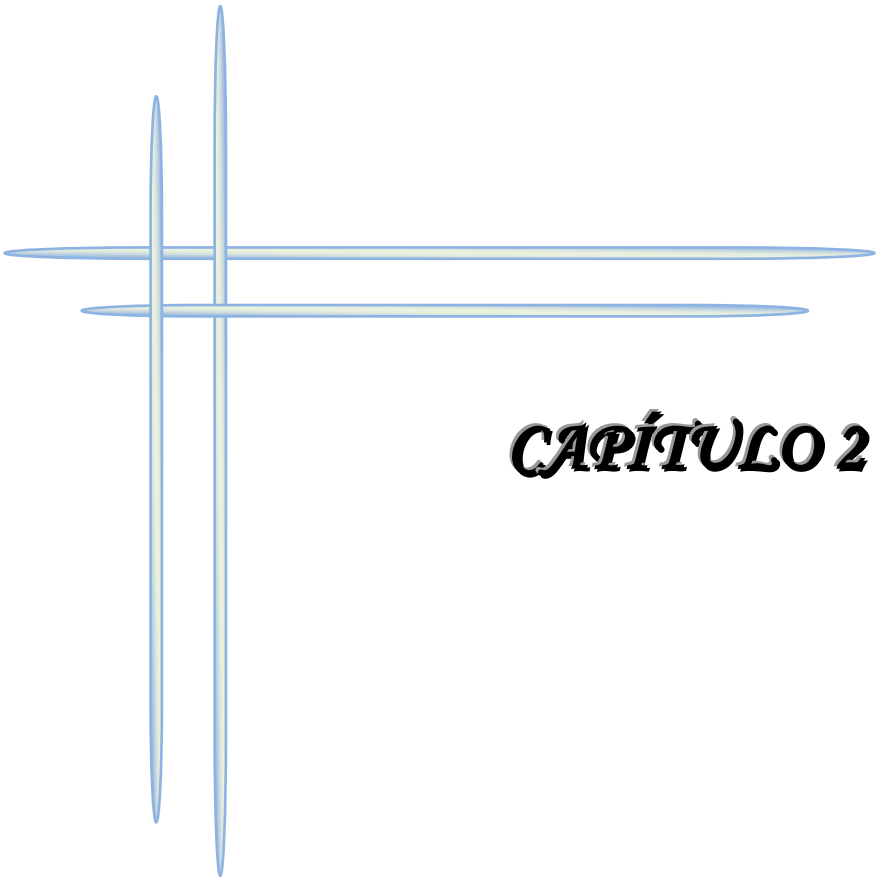
19. Montagner H, Montagner F, Braun KO, Peres PE, Gomes BP. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. J Appl Oral Sci 2009;17(5):432-5.
20. García-Sáenz MC, Arias-Puente A, Fresnadillo-Martinez MJ, Matilla-Rodriguez A. In vitro adhesion of Staphylococcus epidermidis to intraocular lenses. J Cataract Refract Surg 2000;26(11):1673-9.
21. Box GE, Hunter JS, Hunter WG. Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 2005. p. 27-32.
22. Atabek D, Sillelioglu H, Olmez A. The efficiency of a new polishing material: nanotechnology liquid polish. Oper Dent 2010; 35(3):362-9.
23. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. A review of the literature. J Clin Periodontol 1995;22(1):1-14.
24. Xu LC, Siedlecki CA. Staphylococcus epidermidis adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. Biomed Mater 2014 31;9(3):035003.
25. Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK, Seal DV, Grimason AM. Enhanced attachment of acanthamoeba to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? Ophthalmology 2003;110(4):765-71.

26. Foka A, Katsikogianni MG, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, Missirlis YF. The combined effect of surface chemistry and flow conditions on Staphylococcus epidermidis adhesion andica operon expression. Eur Cell Mater 2012;24:386-402.
27. Vuong C, Otto M. Staphilococcus epidermidis infections. Microbes Infect 2002;4(4):481-9.
28. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and Techniques used in Estimating Bacteria - Material Interactions. Eur Cells Mat 2004;8:37 AM-57.
29. Shoff ME, Lucas AD, Phillips KS, Brown JN, Hitchins VM, Eydelman MB. The effect of contact lens materials on disinfection activity of polyquaternium-1 andmyristamidopropyl dimethylamine multipurpose solution against Staphylococcus aureus. Eye Contact Lens 2012;38(6):374-8.
30. Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. J Microbiol Methods 2007;70(2):236-44.
31. Codling CE, Maillard JY, Russell AD. Source Welsh School of Pharmacy, Cardiff University, Cardiff, UK. Aspects of the antimicrobial mechanisms of action of a polyquaternium and an amidoamine. J Antimicrob Chemother 2003;51(5):1153-8.

32. Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition. J Dent 2013;41(12):1281-9.
33. de Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on Candida spp. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. J Prosthet Dent 2011;105(1):51-8.
34. Davison WM, Pitts B, Stewart PS. Spatial and temporal patterns of biocide action against Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(7):2920-7.
35. Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. Clin Orthop Relat Res 2004; (427):4-12.
36. Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol 2009;7(8):555-67.
37. Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. J Clin Periodontol 1988;15(7):415-24.
38. Denton GW. Chlorhexidine. In: Block SS, ed. Disinfection, sterilization, andpreservation. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:321-36.
39. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and

microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Am Dent Assoc 2012;143(3):270-7.

40. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of Staphylococcus epidermidis. J Antimicrob Chemother 2008;62(5):1031-6.



CAPÍTULO 2

ESTABILIDADE DE COR DE BOTÕES DE ÍRIS ARTIFICIAIS VARIANDO A COR E AS TÉCNICAS DE OBTENÇÃO EM PRÓTESE OCULAR ANTES E APÓS POLIMERIZAÇÃO DA RESINA ACRÍLICA INCOLOR

3.1 RESUMO

As próteses oculares são responsáveis pela recuperação da estética e auto-estima do usuário. Sabe-se que o que mais interfere na longevidade das próteses oculares é a instabilidade de cor das íris, devido à polimerização das próteses e o uso clínico. Dessa forma, este estudo teve como propósito avaliar o efeito de três diferentes técnicas de confecção de prótese ocular na alteração de cor de botão de íris artificial, para duas tonalidades de cor antes e após polimerização da resina acrílica incolor. Para isso foram confeccionadas 60 amostras simulando prótese ocular, sendo metade dessas amostras com íris artificial na cor azul e a outra metade na cor marrom. Para cada cor, dez amostras de cada técnica (convencional (PE), técnica com calota pré-fabricada (CA) e pintura invertida (PI)) foram confeccionadas. A leitura de cor dos botões de íris artificiais foi realizada por meio da espectrofotometria de reflexão, usando o sistema CIE L*a*b*, antes (B) e após polimerização da resina acrílica incolor sobre a pintura (P). A alteração de cor (ΔE) foi calculada para os períodos entre P e B (PB). Os dados obtidos foram submetidos à análise

de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (α=0,05). Pelos resultados observou-se que todas as amostras apresentaram alteração de cor das íris artificiais logo após polimerização da resina acrílica incolor. A técnica CA (ΔE=6,79 para cor azul; ΔE=4,93 para cor marrom) apresentou os maiores valores de alteração de cor (*P*<0,05). Considerando os botões de íris na cor marrom, a técnica PI (ΔE=0,64) apresentou os menores valores de alteração de cor (*P*<0,05). A cor marrom apresentou menores valores, estatisticamente significante, de alteração de cor do botão de íris artificial, em relação à cor azul, para todas as técnicas (*P*<0,05) após polimerização. Pode-se concluir que as diferentes técnicas utilizadas para confecção da prótese ocular influenciaram de forma significante a estabilidade de cor da íris artificial, para ambas as cores utilizadas.

PALAVRAS-CHAVE: Estética. Coloração. Espectrofotometria. Resina acrílica. Olho artificial.

3.2 INTRODUÇÃO

O uso de uma prótese ocular pode oferecer boa cosmética e resultados funcionais[1-3]. Na prótese ocular a estética e a harmonia facial são alcançadas pela perfeita confecção e manutenção cromática da íris artificial[4,5]. Além disso, o alcance de seu contorno e volume adequados é constituído pela esclerótica e o botão de íris artificial, que é a associação da pintura com a calota incolor, a qual deve permitir, pela sua translucidez, a visualização da íris artificial, em profundidade e naturalidade, semelhante ao olho natural[6,7].

Um problema frequentemente encontrado durante a reabilitação com próteses oculares é a alteração da cor da íris durante o processo de polimerização da resina acrílica incolor sobre a pintura da íris artificial[8,9]. Pensando assim, alguns autores[9,10] se preocuparam em realizar variadas técnicas de obtenção do botão de íris artificial, como a pintura convencional e mistura de monômero-polímero sobre a íris artificial, a técnica da pintura invertida com a utilização de calotas pré-fabricadas[11] e, também, a reprodução impressa ou fotográfica da íris sã do paciente, associada a mistura de monômero-polímero ou a calotas pré-fabricadas[6].

Além disso, a instabilidade de cor pode variar em relação à qualidade da tinta e tonalidade do pigmento utilizado[9,10]. Alguns estudos demonstraram que a tinta a óleo apresenta melhor estabilidade de cor frente à ação degradante dos agentes ambientais[5,10], e os pigmentos

escuros apresentam maior resistência aos efeitos degradantes do processo de polimerização da resina acrílica[4,9].

* Artigo será formatado segundo normas da Revista *Journal of Biomedical Optics (*Anexo A).

3.3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo foi avaliar o efeito de três diferentes técnicas de confecção de prótese ocular na alteração de cor de botão de íris artificial (calota ocular incolor associada à pintura), para duas tonalidades de cor, antes e após a polimerização da resina acrílica incolor. A hipótese do estudo é que a estabilidade de cor do botão de íris artificial pode variar entre as três diferentes técnicas e para as duas tonalidades de cor.

3.4 MATERIAL E MÉTODO

Foram confeccionadas 60 amostras simulando próteses oculares, sendo metade dessas amostras com íris artificial, na cor azul, e a outra metade, na cor marrom. Para a pintura das íris artificiais, selecionou-se tinta a óleo, devido a sua melhor estabilidade de cor frente ao envelhecimento[5,10] selecionaram-se, também, duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (N1 para esclera e incolor), calotas oculares específicas para prótese ocular e adesivo líquido, a serem utilizadas na confecção das amostras (Tabela 1). As técnicas de confecção do botão de íris ocular foram: técnica convencional (prensagem da resina acrílica sobre a pintura do disco em papel) (PE), técnica com calota pré-fabricada (base da calota ocular posicionada sobre a pintura do disco em papel) (CA) e pintura invertida (base da calota ocular pintada) (PI). Para cada cor (azul ou marrom), dez amostras de cada técnica empregada foram confeccionadas.

Tabela 1. Materiais utilizados para a confecção das amostras.

Marca Comercial	Cor	Fabricante	Lote
Tinta a óleo (Tinta para pintura)	Azul cobalto/ Marrom	Acrilex Tintas Especiais S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brasil	84113/714641
N1 para esclera artificial (Resina acrílica)	Branca	Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil	10234680006
Incolor para prótese ocular (Resina acrílica)	Incolor	Artigos Odontológicos Clássico Ltda.	10234680006
Calotas oculares para prótese ocular (Resina acrílica)	Incolor	Artigos Odontológicos Clássico Ltda.	000248
J-305, Monopoly Syrup (Adesivo liquido)	Incolor	Factor II Inc, EUA	B051811

Obtenção das amostras

As amostras foram confeccionadas com auxílio de matrizes metálicas (modificadas segundo a técnica preconizada por Goiato et al. (2009)[5]), de formato retangular, medindo 30mm de comprimento, 20mm de largura e 2mm de espessura, com demarcação circular no centro com 13mm de diâmetro. Após a obtenção das matrizes metálicas, foram posicionadas calotas oculares incolores de resina acrílica pré-fabricada, no centro das matrizes, sobre a demarcação. Essas calotas foram fixadas sobre a matriz, com auxílio de cera rosa nº 7 (Wilson, Polidental, São Paulo, SP, Brasil).

O conjunto, matriz metálica e calota incolor, foram incluídos em mufla própria para polimerização em forno microondas (Artigos Odontológicos Clássico S.A., São Paulo, SP, Brasil). Durante a inclusão, com gesso pedra Tipo IV (Durone, São Paulo, SP, Brasil), foi utilizado, para o revestimento das superfícies das calotas e da matriz metálica, silicone laboratorial extra-duro (Zetalabor; Zhermack, Rovigo, Itália). Após isso, as muflas foram abertas e o conjunto matriz associado à calota incolor foi removido. A região do molde, correspondente ao formato da calota ocular, foi isolada por vaselina, sendo preenchida com silicone laboratorial para a prensagem da resina acrílica N1.

A resina acrílica N1 foi manipulada de acordo com a instrução do fabricante, sendo prensada em mufla e levada a uma prensa hidráulica (Midas Dental Products Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com força de 1,2Kg/F, durante 2 minutos. A polimerização da resina foi realizada com energia de microondas (BC 30 LTS Maxi; Brastemp, São Paulo, SP, Brasil), utilizando 60% de sua potência máxima durante 3 minutos[5,9]. Após a polimerização da resina, a mufla foi novamente aberta e o silicone que preencheu o molde da calota ocular foi removido, para serem prensados os botões de íris artificiais (calota incolor associada à pintura).

A obtenção das íris artificiais foi realizada por meio da pintura com tinta a óleo em três camadas sobre discos de cartolina preta ou sobre a face plana da calota ocular (pintura invertida), ambos apresentando diâmetro de 13 mm, durante o mesmo período e sob as mesmas

condições de iluminação. A secagem da pintura foi obtida por exposição direta a uma fonte de luz infravermelha (Empalux Ltda., Curitiba, PR, Brasil)[5,9]. Para obtenção dos botões de íris artificiais das amostras na técnica convencional (PE), foi realizada a prensagem de resina acrílica sobre a pintura do disco em papel. Para isso, os discos pintados foram fixados por meio de adesivo líquido, no centro da placa de resina acrílica N1 (Figura 1). Sobre esses discos, foi prensada resina acrílica incolor. Essa resina foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante, sendo inserida nos moldes, para sua posterior prensagem, em uma prensa hidráulica com força de 1,2kgf. A resina foi polimerizada em forno microondas (BC 30 LTS Maxi; Brastemp), utilizando 60% de sua potência máxima (1400 watts), durante 3 minutos[5,9].

Os botões de íris artificiais das amostras, na técnica com calota pré-fabricada, (CA) foram obtidos por meio da fixação da pintura dos discos de cartolina na base das calotas oculares, utilizando o adesivo líquido. Posteriormente, os botões de íris foram fixados por meio de adesivo líquido, no centro da placa de resina acrílica N1 contida na mufla (Figura 1). Na interface entre botão de íris e placa de resina acrílica N1, foi prensada resina acrílica incolor, realizando-se as mesmas etapas descritas anteriormente. Os botões de íris artificiais das amostras da técnica de pintura invertida (PI) foram obtidos por meio da pintura da íris na base da calota ocular, sendo posteriormente fixados por meio de adesivo líquido no centro da placa de resina acrílica N1 contida na mufla

(Figura 1). Na interface botão de íris e placa de resina acrílica termopolimerizável N1, foi prensada resina acrílica incolor, como já foi descrito anteriormente.

Figura 1. Obtenção das amostras nas técnicas de confecção do botão de íris artificial antes da polimerização da resina acrílica incolor: técnica convencional na íris cor azul e marrom - PE (A); técnica com calota pré-fabricada - CA (B); técnica da pintura invertida – PI (C).

As amostras foram submetidas ao acabamento com pontas abrasivas (Edenta AG, Hauptstrasse, Suíça). As superfícies correspondentes aos botões de íris artificiais foram polidas em um torno de bancada (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil) com pedra pomes (Labordent, São Paulo, São Paulo, Brasil) e branco-de-espanha[5] (Labordent, São Paulo, SP, Brasil). As superfícies correspondentes à base das amostras foram submetidas a polimento em Polidora Automática Lixadeira e Politriz Universal[5] (APL-4, Arotec, Cotia, SP, Brasil). Cada amostra foi mensurada com o auxílio de paquímetro digital de precisão ± 0,02 (500-171-20B,

Mitutoyo, Tóquio, Japão), de forma a obter as dimensões propostas (Figura 2).

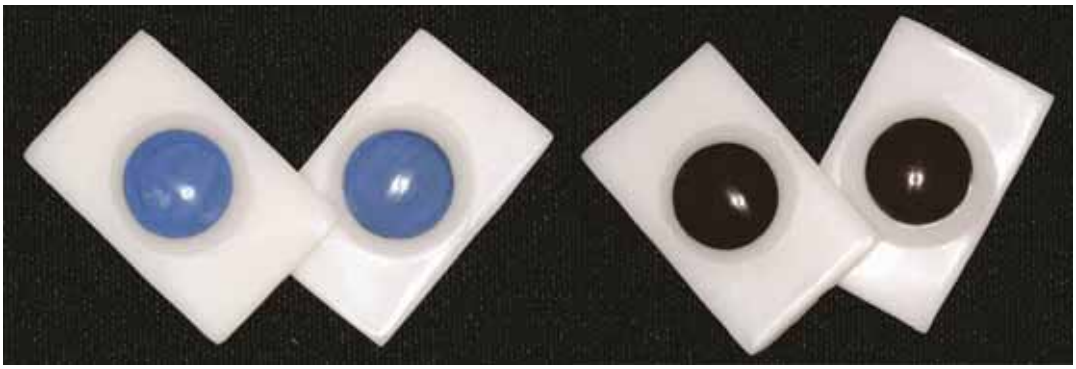


Figura 2. Amostras finalizadas.

Armazenagem das amostras

As amostras foram armazenadas em soro fisiológico por 50 ± 2 horas, em estufa bacteriológica digital (CE-150/280I, CIENLAB Equipamentos Científicos Ltda., Campinas, SP, Brasil) a 37 ± 2°C, para serem hidratadas ao mesmo tempo em que o monômero residual foi eliminado[5].

Avaliação da estabilidade de cor

Após esse procedimento, foram realizadas leituras de cor iniciais por espectrofotometria de reflexão ultravioleta visível, no diâmetro do botão de íris artificial. As alterações de croma e luminosidade foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro de reflexão* (UV-2450, Shimadzu Corp, Kyoto, Japão), com as alterações de cor calculadas por

meio da Comissão Internacional de Iluminação (CIE) pelo sistema L*a*b*, com iluminação padrão D65[5,9]. O CIE L*a*b* permite a especificação de percepções de cores em termos de espaço tridimensional através do comprimento de onda versus reflexão. O valor de "L" é conhecido como brancura ou brilho de um objeto e varia de 0 (preto) a 100 (branco perfeito). O valor "a" representa a quantidade de vermelho (valores positivos) e verde (valores negativos), enquanto o valor "b" representa a quantidade de amarelo (valores positivos) e azul (valores negativos). Os parâmetros "a" e "b" coexistem no mesmo plano, dentro deste espaço tridimensional.

As leituras de cor do botão de íris artificial das amostras foram realizadas em um período inicial (B) e após polimerização da resina acrílica incolor sobre a pintura (P). A variação de cor foi calculada para as três mensurações entre dois períodos por meio da fórmula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$. As amostras foram posicionadas da mesma forma usando um dispositivo de metal revestido na cor preta, fabricado pelos autores e adaptado no espectrofotômetro (UV-2450; Shimadzu Corp) utilizado no presente estudo; este dispositivo foi confeccionado para padronizar a área de leitura e impedir variações na cor.

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) dois-fatores foi realizada para verificar se houve diferenças significativas entre as técnicas de confecção

de botão de íris artificial e as duas tonalidades de cor utilizadas. As diferenças nos valores obtidos para os testes realizados foram comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer HSD. Todos os resultados foram analisados em nível alfa de 0,05.

3.5 RESULTADOS

A análise de variância (ANOVA) mostrou diferença estatística significante entre tonalidade de cor e técnica (*P*<0,05) na alteração de cor dos botões de íris artificiais (Tabela 2). A Tabela 3 apresenta os valores médios e o desvio padrão de alteração de cor do botão de íris artificial para o período mensurado entre P e B. Pelos resultados observou-se que todas as amostras apresentaram alteração de cor do botão de íris artificial após a polimerização da resina acrílica incolor. As amostras confeccionadas pela técnica CA (ΔE=6,79 para cor azul; ΔE=4,93 para cor marrom) apresentaram os maiores valores de alteração de cor do botão de íris artificial, estatisticamente significante (*P*<0,05) (Tabela 3). Entretanto pode-se verificar menores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,05), para os botões de íris artificiais na cor marrom, confeccionados pela técnica PI (ΔE=0,64). Para o botão de íris artificial na cor azul, não houve diferença significante (*P*>0,05), entre as técnicas PE e PI (ΔE=3,66; ΔE=4,38), respectivamente. Além disso, os botões de íris artificiais na cor marrom apresentaram menores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,05), em relação à cor azul, para todas as técnicas avaliadas (*P*<0,05) (Tabela 3).

Tabela 2. Resultados de Análise de Variância (ANOVA) dois-fatores.

Fatores	***gl***	**SQ**	**QM**	**F**	***P***
Técnica	2	134,79	67,39	144,40	< 0,001*
Cor	1	85,63	85,63	183,46	< 0,001*
Técnica × Cor	2	13,98	6,99	14,98	< 0,001*
Erro	54	25,20	0,47		
Total	59	259,60			

*P < 0,05 denota diferença estatística significante

Tabela 3. Valores médios e Desvio Padrão (DP) de alteração de cor (ΔE) das amostras.

Técnica	**Cor**	
	Azul	**Marrom**
PE	3,66 (0,90) Aa	2,09 (0,59) Ab
CA	6,79 (0,70) Ba	4,93 (0,61) Bb
PI	4,38 (0,85) Aa	0,64 (0,16) Cb

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância (P<0,05), pelo teste de Tukey.

A tabela 4 apresenta os valores médios e desvio padrão dos parâmetros ∆L*, ∆a* e ∆b* doss botões de íris artificiais referente a mensuração realizada nos períodos P e B. Em relação ao parâmetro L* das amostras confeccionadas pelas técnicas PE e PI, de ambas as cores, os valores moveram-se na direção do branco perfeito; enquanto que para a técnica CA isso ocorreu em direção ao preto. Durante o período PB os valores do parâmetro a* das amostras com botões de íris artificiais na cor azul, distanciaram-se do vermelho, enquanto que os valores do parâmetro b* distanciaram-se do azul. As amostras confeccionada pelas técnicas PE

e CA com botões de íris artificiais na cor marrom, apresentaram os valores do parâmetro a* aproximando-se do vermelho, e os valores do parâmetro b* aproximando-se do amarelo; enquanto pode-se observar o oposto para as amostras da técnica PI na mesma cor do botão de íris artificial. Assim, pode-se sugerir que as técnicas PE e PI exibiram a mesma tendência de aumento na iluminação/brilho para ambas as cores; ao contrário da técnica CA durante o período PB. De forma geral, a técnica CA apresentou maior alteração de cor para L*, b*, a* em relação às outras técnicas, produzindo aumento nos valores de ΔE (Tabelas 3-4).

Tabela 4. Valores médios (DP) de ΔL, Δa e Δb das diferentes técnicas de confecção de botão de íris artificial para as duas tonalidades de cor.

Técnica/Cor	**Período Mensurado**	**L***	**a***	**b***	**ΔL***	**Δa***	**Δb***
PE/azul	**B**	25,85	6,13	-25,98			
	P	30,71	4,29	-23,64	1,86 (0,57)	-1,84 (0,53)	2,34 (0,78)
CA/azul	**B**	42,03	5,33	-24,49			
	P	37,11	2,33	-21,01	-4,92 (0,72)	-3,00 (0,61)	3,48 (0,65)
PI/azul	**B**	34,72	5,92	-28,57			
	P	34,82	4,18	-24,67	0,10 (0,81)	-1,74 (0,52)	3,90 (0,93)
PE/marrom	**B**	22,01	1,93	0,92			
	P	23,80	2,52	1,72	1,79 (0,51)	0,60 (0,23)	0,81 (0,47)
CA/marrom	**B**	36,05	1,46	0,61			
	P	31,32	2,23	1,73	-4,73 (0,59)	0,76 (0,18)	1,11 (0,25)
PI/marrom	**B**	25,56	3,28	3,26			
	P	25,69	2,95	2,92	0,13 (0,37)	-0,34 (0,15)	-0,34 (0,22)

3.6 DISCUSSÃO

Diversas técnicas para a confecção de prótese ocular têm sido desenvolvidas, com o propósito de oferecer aos pacientes melhor dissimulações e maior durabilidade. A hipótese do estudo em que a estabilidade de cor de botão de íris artificial pode variar entre as três diferentes técnicas e para as duas tonalidades de cor foi aceita, porque houve diferença na alteração de cor do botão de íris artificial para cor e técnica (Tabela 2). No presente estudo observou-se que todas as amostras apresentaram alteração de cor do botão de íris artificial (Tabela 3). Estudos anteriores demonstraram que o manchamento da íris artificial ocorria principalmente após o processo de polimerização da resina acrílica incolor[4,9]. Associado a isso, deve-se considerar a superfície e luminosidade do objeto como fatores influentes na determinação da cor[5,7,12,13].

A polimerização ocorre para a obtenção da esclera artificial, em resina acrílica específica para a mesma, e após a sua caracterização, em resina acrílica incolor para a obtenção da camada transparente a íris artificial. No presente estudo os botões de íris artificiais confeccionados pelas diferentes técnicas apresentaram alteração de cor, sendo aqueles pela técnica CA, os quais apresentaram menor estabilidade de cor, estatisticamente significante (P<0,05); característica detectada por espectrofotometria (Tabelas 2-3). Ao contrário do que ocorreu, a utilização

de calotas pré-fabricadas deveria impedir a ação do monômero residual sobre a pintura, e assim, a alteração de cor deveria ser menor. No entanto, esse fato pode estar associado à composição dos materiais utilizados para a confecção das amostras, pois, tinta e calota, são polímeros e com isso, uma possível interação entre estes componentes poliméricos presentes em todos os produtos com base de metil metacrilato durante o processo de polimerização pode ter ocorrido, explicando a alteração de cor verificada nas amostras[9,10,14].

Além disso, o processo de polimerização da resina incolor termopolimerizável e a resina que compõe as tintas podem ter afetado as ligações químicas das tintas e promovido troca de ligações ou quebra destas[14]. Este grau de instabilidade das ligações vem promover maior ou menor alteração de cor. Outro fator a ser considerável são os componentes das tintas utilizados, os quais podem ter liberado resíduos ou permitir a evaporação de solventes orgânicos voláteis durante o processo de secagem, que posteriormente reagiram com a resina acrílica embutida sobre a pintura. Com isso, o papel cartolina suporte da tinta utilizado na técnica CA, pode ter degradado superficialmente corroborando com esta liberação de solventes.

De acordo com estudos anteriores, o grau de polimerização interfere nas propriedades mecânicas das resinas, e esta, por sua vez, podem interferir em outras propriedades como a opacidade[7,15-17]. De acordo com o fabricante, as calotas oculares, são confeccionadas com

resina termopolimerizável, incluída em moldes de aço e aquecida, com temperatura e tempo não informados, sem adição de monômeros. Desse modo, poderíamos inferir que o botão de íris artificial confeccionadas pela técnica CA apresentariam características físicas diferentes quando comparadas a técnica PE, em função do ciclo de polimerização. Contudo, por desconhecimento da composição química minuciosa de todos os materiais deste estudo, não se pode afirmar que esse fator foi atuante sobre a alteração de cor.

Além disso, a instabilidade de cor pode variar em relação à tonalidade do pigmento utilizado. No presente estudo a tinta a óleo cor marrom foi considerada mais estável em relação à cor azul (Tabelas 2-3). De acordo com Goiato et al. (2010)[9], os pigmentos escuros apresentam maior resistência aos efeitos degradantes, devido à formação de ligações químicas mais estáveis, não sujeitas à quebra durante a polimerização. Quanto à tinta na cor azul, esta apesar de possuir resistência à luz, apresenta baixo poder de cobertura[10], fato que pode ter ocasionado os maiores valores de alteração de cor desta em relação à tinta na cor marrom. Acredita-se que a tinta na cor azul durante o processo de prensagem e polimerização adquiriu instabilidade de seus componentes químicos de forma diferente do pigmento marrom. A alteração que ocorreu entre as cores, é uma questão a ser ressaltada, pois pode vir a interferir no resultado final da reprodução da íris artificial. Dessa forma a interação de cores primárias de diferentes tonalidades pode gerar

instabilidade em cores secundárias. Pode-se sugerir também que as tintas azuis apresentam componentes de grupamentos químicos distintos ocasionando instabilidade em suas propriedades físico-químicas.

A alteração da brancura/brilho dos botões de íris artificiais verificada pela avaliação do parâmetro L* (Tabela 4) foi similar a outros estudos, que relatam distorção da cor da íris pela refração da luz, após polimerização[9,11,18]. Desta forma, a alteração de cor das amostras promovida pela variação das técnicas pode estar associada a fatores intrínsecos como alterações em sua matiz[19]. Portanto, esta mudança explicaria os valores de alteração observados em L*, a* e b*, contribuindo para o maior aumento nos valores de ΔE (Tabelas 3-4).

Considerando as limitações deste estudo, os procedimentos laboratoriais in vitro simulando a confecção de próteses oculares não foram completamente semelhantes aos protocolos utilizados por outros autores, desde que poucos estudos avaliaram a alteração de cor após o processo de polimerização. Alguns outros fatores que podem também influenciar a estabilidade de cor do botão de íris artificial são a porosidade inerente à técnica[18,20], falhas na superfície do material e polimento superficial[21,22]. Portanto pesquisas futuras são necessárias para investigar estas interações.

3.7 CONCLUSÃO

- ✓ As amostras confeccionadas pela técnica com calota pré-fabricada apresentaram os maiores valores de alteração de cor.
- ✓ Os botões de íris artificiais de cor marrom apresentaram os menores valores de alteração de cor.

3.8 REFERÊNCIAS

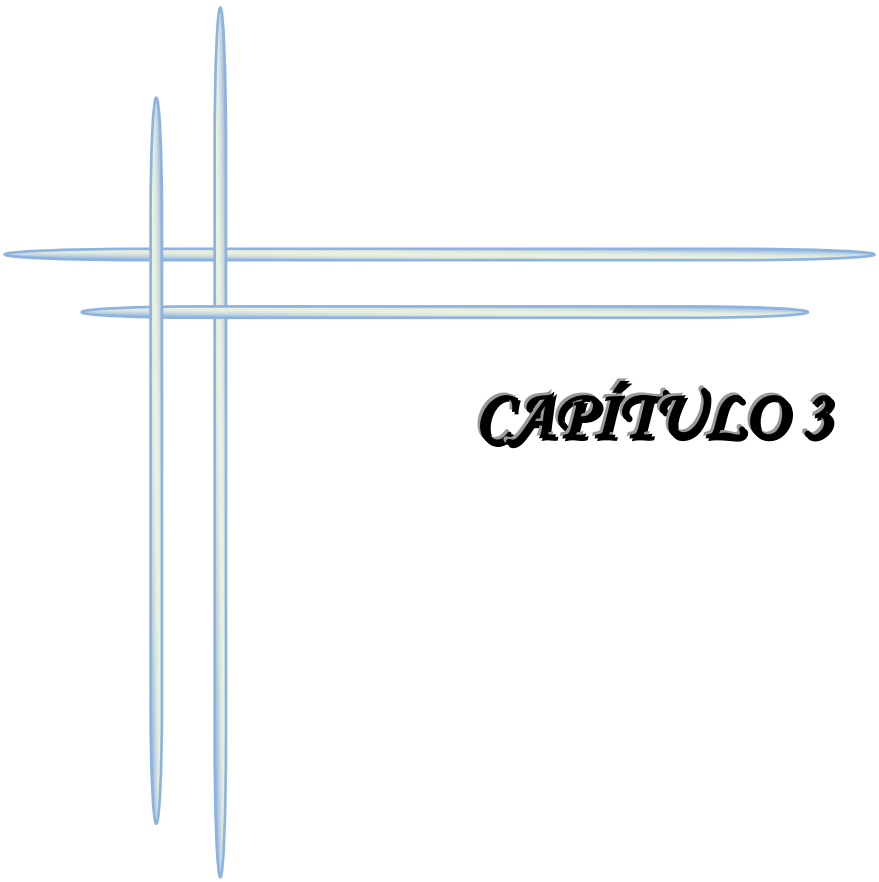
1. Song JS, Oh J, Baek SH. A survey of satisfaction in anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2006;244(3):330-5.
2. Garg P, Garg S, Bansal D, Suresh S. Prosthetic rehabilitation of a patient with enucleated eye - a case report. Nepal J Ophthalmol 2012;4(2):312-4.
3. Goiato MC, Santos DM, Bannwart LC, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF, Santos EG. Psychosocial impact on anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. Int J Oral Maxillofac Surg 2013;42(1):113-9.
4. Reis RC, Dias RB, Carvalho JCM. Evaluation of Iris Color Stability in Ocular Prosthesis. Braz Dent J 2008;19(4):370-4.
5. Moreno A, Goiato MC, Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Influence of different disinfecting solutions on the color change of artificial irises used in ocular prostheses. Color Research and Application 2014;39(1):56-62.
6. Artopoulou II, Montgomery PC, Wesley PJ, Lemon JC. Digital imaging in the fabrication of ocular prostheses. J Prosthet Dent 2006;95(4):327-30.
7. Fernandes AU, Goiato MC, dos Santos DM. Effect of weathering and thickness on the opacity of acrylic resin and ocular button for

artificial eyes. J Craniofac Surg 2010;21(1):64-7.

8. Reitemeier B, Notni G, Heinze M, Schone C, Schmidt A, Fichtner D. Optical modeling of extraoral defects. J Prosthet Dent 2004;91(1):80-4.
9. Goiato MC, Moreno A, Dos Santos DM, de Carvalho Dekon SF, Pellizzer EP, Pesqueira AA. Effect of polymerization and accelerated aging on iris color stability of ocular prosthesis. Cont Lens Anterior Eye 2010;33(5):215-8.
10. Goiato MC, Fernandes AU, Santos DM, Hadadd MF, Moreno A, Pesqueira AA. Alteration of blue pigment in artificial iris in ocular prosthesis: Effect of paint, drying method and artificial aging. Cont Lens Anterior Eye 2011;34(1):22-5.
11. Rossa R. Iris painting. In Graziani, M. Maxilofacial prosthesis. 3rd ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1982. p.211-12.
12. Billmyer PW, Sdman M. Principles of color technology. New York: Wiley; 2000. 247 p.
13. Lee YK, Lim BS, Kim CW. Influence of illuminating and viewing aperture size on the color of dental resin composites. Dent Mater 2004;20(2):116-23.
14. Fernandes AUR, Goiato MC, Batista MAJ, Santos DM. Color alteration of the paint used for iris painting in ocular prostheses. Braz Oral Res 2009;23(4):386–92.

15. Dogan A, Bek B, Cevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. J Dent 1995;23(5):313-8.
16. Lung CY, Darvell BW. Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic. Dent Mater 2005;21(12):1119-28.
17. Powers JM, Sakaguchi RL. Optical, Thermal, and Electrical Properties. In: Craig RG, editor. Craig's restorative dental materials. St. Louis: Elsevier; 2006. p 149-160.
18. Bannwart LC, Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF, Andreotti AM, de Medeiros RA. Chromatic changes to artificial irises produced using different techniques. J Biomed Opt 2013;18(5):58002.
19. Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental. 12th ed. In: Chemical and Physical Properties of Solids. Philadelphia: Saunders Elsevier Publisher; 2013. p.30-47.
20. Canadas MD, Garcia LF, Consani S, Pires-de-Souza FC. Color stability, surface roughness, and surface porosity of acrylic resins for eye sclera polymerized by different heat sources. J Prosthodont 2010;19(1):52-7.
21. Goiato MC, Santos DM, Souza JF, Moreno A, Pesqueira AA. Chromatic stability of acrylic resins of artificial eyes submitted to accelerated aging and polishing. J Appl Oral Sci 2010;18(6):641-5.

22. Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. Gerodontology 2013;30(1):32-9.



CAPÍTULO 3

EFEITO DE SOLUÇÕES DESINFETANTES SOBRE A ESTABILIDADE DE COR DE BOTÕES DE ÍRIS ARTIFICIAIS OBTIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS PARA DUAS TONALIDADES DE COR.

4.1 RESUMO

A cor da íris artificial com estética aceitável é uma importante condição clínica para a reabilitação ocular. Dessa forma, este estudo teve como propósito avaliar a influência de três soluções desinfetantes, na alteração de cor do botão de íris artificial obtido por diferentes técnicas, para duas tonalidades de cor. Foram confeccionadas 300 amostras simulando próteses oculares, sendo metade dessas amostras com íris artificial na cor azul e a outra metade na cor marrom. Para cada cor, cinquenta amostras de cada técnica empregada (técnica convencional (PE), técnica com calota pré-fabricada (CA) e pintura invertida (PI)) foram confeccionadas. Para cada técnica empregada, 10 amostras foram submetidas a três tipos de soluções desinfetantes (sabão neutro (NES), Opti-Free (OPF) e clorexidina a 4% (CHX)); ou permaneceram sem desinfecção (C1, imersas em soro fisiológico e C2 restritas a ambiente seco). A desinfecção foi realizada por 240 dias, sendo as amostras desinfetadas, armazenadas em soro fisiológico durante esse período. A leitura de cor dos botões de íris artificial foi realizada por meio da espectrofotometria de reflexão, usando o sistema CIE L*a*b*, no período inicial (B) e após os períodos de desinfecção e armazenagem (60 (T_1),

120 (T_2), e 240 (T_3) dias). A alteração de cor (ΔE) foi calculada para os períodos entre T_1 e B (T_1B), T_2 e B (T_2B), e T_3 e B (T_3B). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (α=0,05). Pode-se verificar pela análise ANOVA diferença estatística significante nos valores de alteração de cor do botão de íris artificial entre técnica x desinfetante x período; técnica x cor x período; e desinfetante x cor x período (*P*<0,001). Os botões de íris artificiais na cor azul confeccionados pelas técnicas PE e CA, apresentaram maior estabilidade de cor (*P*<0,001), nos períodos de desinfecção e armazenagem. Os botões de íris artificiais desinfetados com CHX em ambas as cores, apresentaram maiores valores de alteração de cor (*P*<0,001), em relação aos respectivos tratamentos controle. Em conclusão, amostras com botão de íris artificial na tonalidade azul apresentaram menor estabilidade de cor entre as diferentes técnicas; bem como o período de desinfecção e armazenagem influenciou de forma significante a alteração de cor para ambas as cores.

PALAVRAS-CHAVE: Desinfecção. Cor. Espectrofotometria. Resina acrílica. Olho artificial.

4.2 INTRODUÇÃO

A prótese ocular é, entre as próteses faciais, a que exige maiores recursos técnico-artísticos[1-3], sendo um tratamento reabilitador artificial para os pacientes que sofreram perda total ou parcial do bulbo ocular[4,5]. Esta prótese é constituída pela esclerótica, confeccionada com resina acrílica branca, caracterizada por vênulas, representando a esclera do olho humano. Sobre essa esclerótica é posicionado o botão de íris artificial, que é a associação da pintura com a calota incolor.

Desde a antiguidade, várias eram as tentativas de se reproduzir o globo ocular[6]. Ao longo do tempo vários autores sugeriram as mais variadas técnicas de obtenção do botão de íris artificial, como a pintura convencional e mistura de monômero-polímero sobre a íris artificial[7,8], a técnica da pintura invertida com a utilização de calotas pré-fabricadas[9] e, também, a reprodução impressa ou fotográfica da íris sã do paciente, associada a mistura de monômero-polímero ou a calotas pré-fabricadas[10].

No entanto, um problema de alterações de cor do botão de íris artificial é frequentemente encontrado ao longo do tempo de uso. Assim essas alterações podem ser clinicamente observadas sendo, às vezes, quase imperceptíveis a olho nu; no entanto, elas podem vir a se tornar acentuadas, o suficiente para levar a indicação da confecção de nova prótese, mesmo quando a outra ainda apresenta boa adaptação[11,12].

Alguns estudos ainda demonstram que a instabilidade de cor pode variar em relação à tonalidade do pigmento de coloração da íris estética utilizado[12-14].

Além disso, o sucesso na adaptação e uso de próteses oculares depende de vários fatores, sendo sua manutenção um dos mais importantes[15]. Por isso, é recomendada aos usuários de próteses oculares a desinfecção constante de suas próteses. Entretanto, há evidências de que a exposição frequente a água e soluções desinfetantes podem alterar as propriedades físicas das resinas acrílicas[15-20].

---

* Artigo será formatado segundo normas da Revista *Journal of Biomedical Optics (*Anexo A).

4.3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo foi avaliar a influência de três soluções desinfetantes na alteração de cor do botão da íris artificial (calota incolor associada à pintura), obtido por três diferentes técnicas de confecção em prótese ocular, para duas tonalidades de cor. A hipótese do estudo é que a estabilidade de cor do botão da íris artificial, pode variar entre as tonalidades de cor, quanto aos tipos de técnica de obtenção, soluções desinfetantes e período de desinfecção e armazenagem.

4.4 MATERIAL E MÉTODO

Foram confeccionadas 300 amostras simulando próteses oculares, sendo metade dessas amostras com íris artificial, na cor azul, e a outra metade, na cor marrom. Para a pintura das íris artificiais, selecionou-se tinta a óleo, devido a sua melhor estabilidade de cor frente ao envelhecimento[12,15]; selecionaram-se, também, duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (N1 para esclera e incolor), calotas oculares específicas para prótese ocular e adesivo líquido, a serem utilizadas na confecção das amostras (Tabela 1). As técnicas de confecção do botão de íris ocular foram: técnica convencional (prensagem da resina acrílica sobre a pintura do disco em papel) (PE), técnica com calota pré-fabricada (base da calota ocular posicionada sobre a pintura do disco em papel) (CA) e pintura invertida (base da calota ocular pintada) (PI). Para cada cor (azul ou marrom), cinquenta amostras de cada técnica empregada foram confeccionadas, totalizando 150 amostras (Figura 1). Para cada técnica empregada, 10 amostras foram submetidas aos três tipos de soluções desinfetantes: sabão neutro (NES), Opti-free (OPF), e clorexidina a 4% (CHX) (Tabela 1) ou permaneceram sem desinfecção (controle úmido (C1), imersas em soro fisiológico em estufa bacteriológica digital (CE-150/280I, CIENLAB Equipamentos Científicos Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) a 37 ± 2°C; e controle seco (C2), restritas a ambiente seco onde a luz do dia não pudesse alcançar).

Tabela 1. Materiais utilizados nos estudo.

Marca Comercial	**Cor**	**Fabricante**	**Lote**
Tinta a óleo (Tinta para pintura)	Azul cobalto/ Marrom	Acrilex Tintas Especiais S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brasil	84113/714641
N1 para esclera artificial (Resina acrílica)	Branca	Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil	10234680006
Incolor para prótese ocular (Resina acrílica)	Incolor	Artigos Odontológicos Clássico Ltda.	10234680006
Calotas oculares para prótese ocular (Resina acrílica)	Incolor	Artigos Odontológicos Clássico Ltda.	000248
J-305, Monopoly Syrup (Adesivo liquido)	Incolor	Factor II Inc, EUA	B051811
Sabão Neutro (Desinfetante)	Incolor	Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil	1860B04
Opti-Free Express Solução multi-propósito (Desinfetante)	Incolor	Alcon, EUA	51226
Clorexidina a 4% (Desinfetante)	Incolor	Apothicário, Araçatuba, SP, Brasil	367723

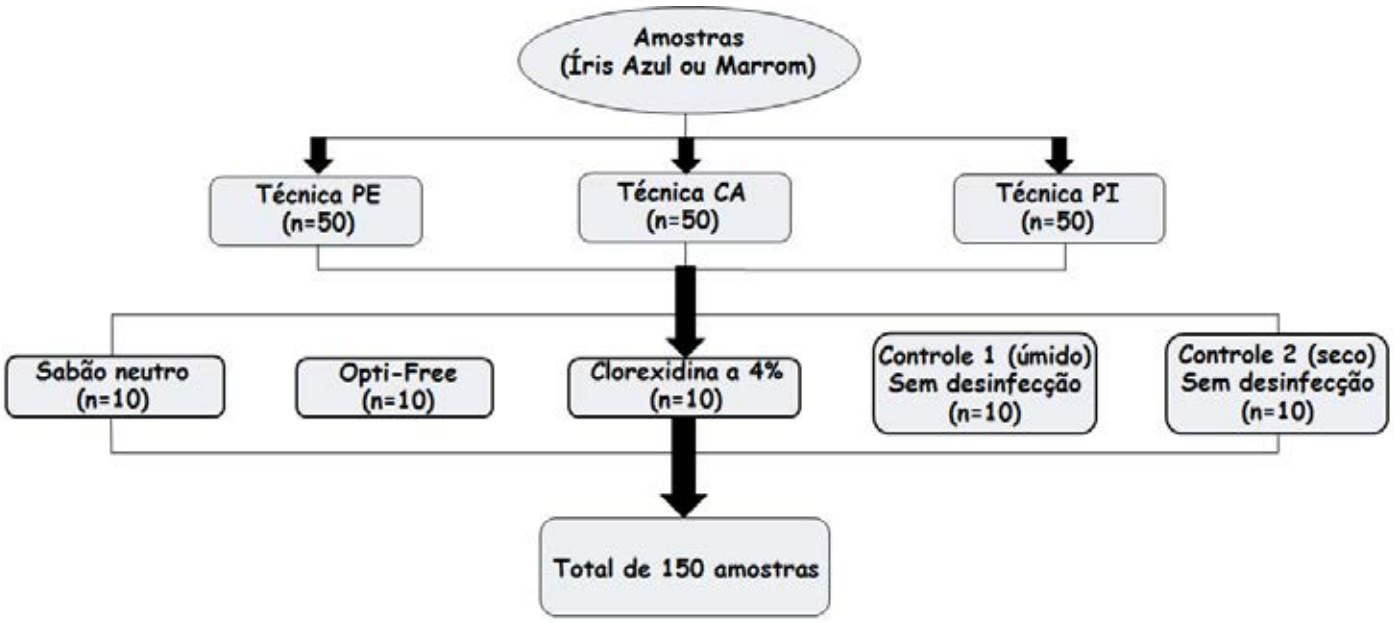


Figura 1. Fluxograma da confecção das amostras.

Obtenção das amostras

As amostras foram confeccionadas com auxílio de matrizes metálicas (modificadas segundo a técnica preconizada por Goiato et al (2009)[15]), de formato retangular, medindo 30mm de comprimento, 20mm de largura e 2mm de espessura, com demarcação circular no centro com 13mm de diâmetro. Após a obtenção das matrizes metálicas, foram posicionadas calotas oculares incolores de resina acrílica pré-fabricada, no centro das matrizes, sobre a demarcação. Essas calotas foram fixadas sobre a matriz, com auxílio de cera rosa nº 7 (Wilson, Polidental, São Paulo, Brasil) (Figura 2).

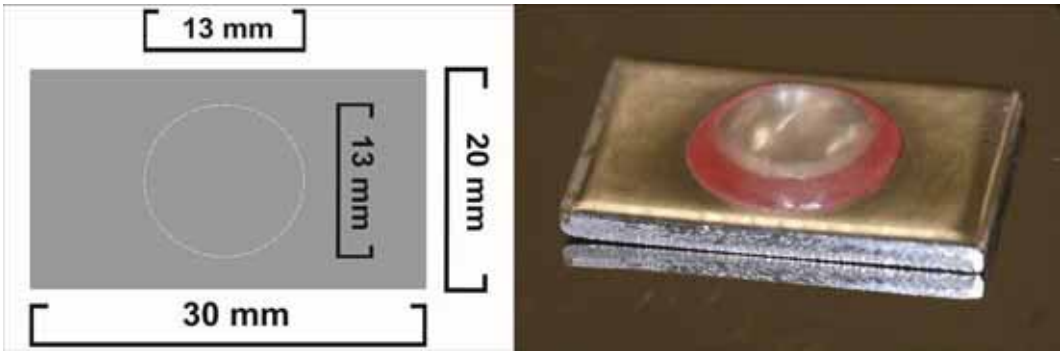


Figura 2. Desenho esquemático das dimensões da matriz metálica e vista superior desta com a calota ocular em posição centralizada.

O conjunto, matriz metálica e calota incolor, foram incluídos em mufla própria para polimerização em forno microondas (Artigos Odontológicos Clássico S.A., São Paulo, SP, Brasil). Durante a inclusão, com gesso pedra Tipo IV (Durone, São Paulo, SP, Brasil), foi utilizado, para o revestimento das superfícies das calotas e da matriz metálica, silicone laboratorial extra-duro (Zetalabor; Zhermack, Rovigo, Itália). Após isso, as muflas foram abertas e o conjunto matriz associado à calota incolor foi removido. A região do molde, correspondente ao formato da calota ocular, foi isolada por vaselina, sendo preenchida com silicone laboratorial para a prensagem da resina acrílica N1.

A resina acrílica N1 foi manipulada de acordo com a instrução do fabricante, sendo prensada em mufla e levada a uma prensa hidráulica (Midas Dental Products Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com força de 1,2Kg/F, durante 2 minutos[15]. A polimerização da resina foi realizada com energia de microondas (BC 30 LTS Maxi; Brastemp, São Paulo, SP,

Brasil), utilizando 60% de sua potência máxima durante 3 minutos[12,15]. Após, a polimerização da resina, a mufla foi novamente aberta e o silicone que preencheu o molde da calota ocular foi removido, para serem prensados os botões de íris artificiais (calota incolor associada à pintura).

A obtenção das íris artificiais foi realizada por meio da pintura com tinta a óleo (azul ou marrom) em três camadas sobre discos de cartolina preta ou sobre a face plana da calota ocular (pintura invertida), ambos apresentando diâmetro de 13 mm, durante o mesmo período e sob as mesmas condições de iluminação. A secagem da pintura foi obtida por exposição direta a uma fonte de luz infravermelha (Empalux Ltda., Curitiba, PR, Brasil)[12,15].

Para obtenção dos botões de íris artificiais das amostras na técnica convencional (PE), foi realizada a prensagem de resina acrílica sobre a pintura do disco em papel. Para isso, os discos pintados foram fixados por meio de adesivo líquido, no centro da placa de resina acrílica termopolimerizável N1. Sobre esses discos, foi prensada resina acrílica incolor. Essa resina foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante, sendo inserida nos moldes, para sua posterior prensagem, em uma prensa hidráulica com força de 1,2kgf. A resina foi polimerizada em forno microondas (BC 30 LTS Maxi; Brastemp), utilizando 60% de sua potência máxima (1400 watts), durante 3 minutos[12,15].

Os botões de íris artificiais das amostras, na técnica com calota pré-fabricada, (CA) foram obtidos por meio da fixação da pintura dos discos de cartolina na base das calotas oculares, utilizando o adesivo líquido. Posteriormente, os botões de íris foram fixados por meio de adesivo líquido, no centro da placa de resina acrílica termopolimerizável N1 contida na mufla. Na interface entre botão de íris e placa de resina acrílica N1, foi prensada resina acrílica incolor, realizando-se as mesmas etapas descritas anteriormente. Os botões de íris artificiais das amostras da técnica de pintura invertida (PI) foram obtidos por meio da pintura da íris na base da calota ocular, sendo posteriormente fixados por meio de adesivo líquido no centro da placa de resina acrílica N1 contida na mufla. Na interface botão de íris e placa de resina acrílica N1, foi prensada resina acrílica incolor, como já foi descrito anteriormente.

As amostras foram submetidas ao acabamento com pontas abrasivas (Edenta AG, Hauptstrasse, Suíça). As superfícies correspondentes aos botões de íris artificiais foram polidas em um torno de bancada (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil) com pedra pomes (Labordent, São Paulo, SP, Brasil) e branco-de-espanha[15] (Labordent, São Paulo, SP, Brasil). As superfícies correspondentes à base das amostras foram submetidas a polimento em Polidora Automática Lixadeira e Politriz Universal[10] (APL-4, Arotec, Cotia, SP, Brasil). Cada amostra foi mensurada com o auxílio de paquímetro digital de precisão ±

0,02 (500-171-20B, Mitutoyo, Tóquio, Japão), de forma a obter as dimensões propostas (Figura 3).

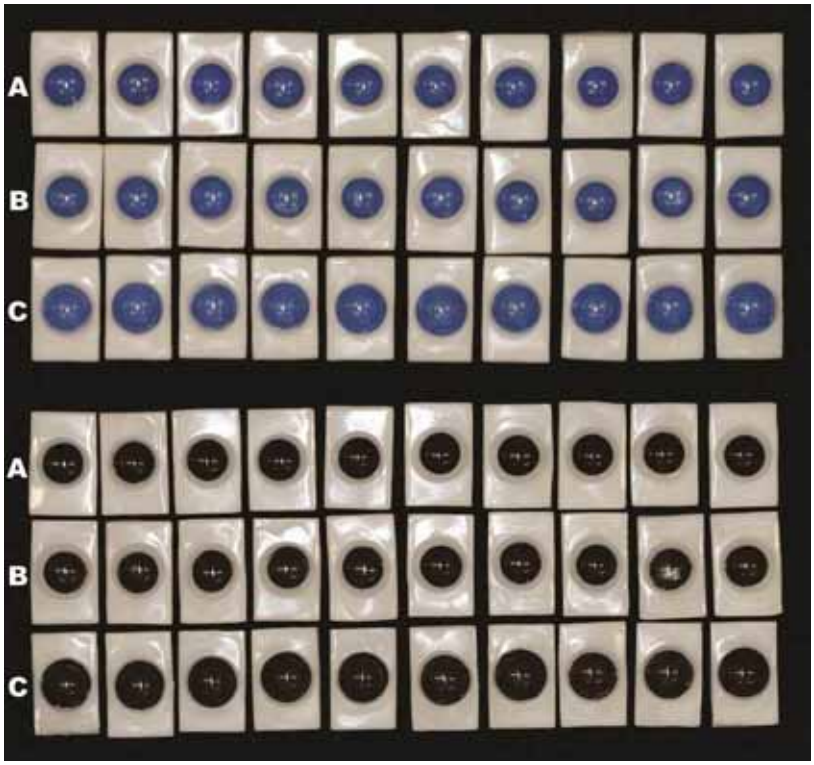


Figura 3. Amostras finalizadas de acordo com as diferentes técnicas de confecção do botão de íris artificial: técnica convencional na íris cor azul e marrom - PE (A); técnica com calota pré-fabricada - CA (B); técnica da pintura invertida – PI (C).

Armazenagem das amostras

As amostras foram armazenadas em potes opacos com 5 mL de soro fisiológico por 50 ± 2 horas, em estufa bacteriológica digital (CE-150/280I, CIENLAB Equipamentos Científicos Ltda.) a 37 ± 2°C, para

serem hidratadas ao mesmo tempo em que o monômero residual foi eliminado[15].

Avaliação da estabilidade de cor

Após esse procedimento, foram realizadas leituras de cor iniciais por espectrofotometria de reflexão ultravioleta visível, no diâmetro do botão de íris artificial. As alterações de croma e luminosidade foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro de reflexão* (UV-2450, Shimadzu Corp, Kyoto, Japão), com as alterações de cor calculadas através da Comissão Internacional de Iluminação (CIE) pelo sistema L*a*b*, com iluminação padrão D65[12,15]. As leituras de cor do botão de íris artificial das amostras foram realizadas em um período inicial (B) e após os períodos de desinfecção e armazenagem (60 (T_1), 120 (T_2), e 240 (T_3) dias). A alteração de cor (ΔE) foi calculada para os períodos entre T_1 e B (T_1B), T_2 e B (T_2B), e T_3 e B (T_3B) por meio da fórmula: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{½}$.

As amostras foram posicionadas da mesma forma usando um dispositivo de metal revestido na cor preta, e adaptado no espectrofotômetro (UV-2450; Shimadzu Corp) utilizado no presente estudo; este dispositivo foi confeccionado para padronizar a área de leitura e impedir variações na cor. Os níveis de alteração de cor (ΔE) foram também quantificados pela National Bureau of Standards (NBS)[21] unidades de diferença de cor (<3,0 NBS unidades – nível aceitável

clinicamente). NBS unidades é expressa pela seguinte fórmula: NBS unidade = ΔE x 0,92.

Desinfecção e armazenagem das amostras

O processo de desinfecção e armazenagem foi realizado por um período de 240 dias. As amostras foram desinfetadas diariamente, por meio de fricção manual durante 1 minuto com auxílio de gaze, sendo em seguida enxaguadas em água corrente por 30 segundos[15,22]. Durante este período de desinfecção, todas as amostras enquanto não estivessem sendo desinfetadas, encontravam-se armazenadas em potes opacos contendo 5 mL de soro fisiológico em estufa bacteriológica digital (CE-150/280I, CIENLAB Equipamentos Científicos Ltda.) a 37 ± 2°C. As amostras que permaneceram sem desinfecção em ambiente úmido, seguiram as mesmas regras de armazenagem citadas previamente durante 240 dias. Enquanto que as amostras que permaneceram em ambiente seco, foram armazenadas no interior de potes opacos, sem a presença de qualquer líquido, onde a luz do dia não pudesse alcançar.

Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) quatro-fatores medidas repetidas foi realizada para verificar se houve diferenças significativas entre as tonalidades de cor, técnicas de confecção de botão de íris artificial, desinfetantes utilizados e período de desinfecção e armazenagem. As

diferenças nos valores obtidos para os testes realizados foram comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer HSD. Todos os resultados foram analisados em nível alfa de 0,05.

4.5 RESULTADOS

A tabela 2 apresenta os valores médios e desvio padrão de alteração de cor do botão de íris artificial, para cada período mensurado. Os valores de alteração de cor para ambas as cores de botão de íris artificial aumentaram ao longo do tempo (Tabela 3). Na análise de variância (ANOVA) pode-se observar diferença estatística significante (P<0,001), nos valores de alteração de cor do botão de íris artificial entre técnica x desinfetante x período; técnica x cor x período; e desinfetante x cor x período (Tabela 3). Entretanto não hove diferença estatística sinigifcante (P>0,05) na interação entre todos os fatores do estudo (técnica x desinfetante x cor x período) (Tabela 3).

Considerando os botões de íris artificiais na cor azul, para cada técnica, independente do desinfetante utilizado, pode-se verificar menores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (P<0,001), para as técnicas PE e CA em comparação à técnica PI, em todos os períodos mensurados; com exceção da técnica CA no período T_1B (ΔE=1,34) (Tabela 4). Entretanto não houve diferença de alteração de cor, estatísticamente significante (P>0,05), para os botões de íris artificiais na cor marrom entre as técnicas utilizadas; com exceção da técnica PE (ΔE=0,73) em relação a técnica PI (ΔE=0,88), ambos no período T_3B (Tabela 4). Além disso, os botões de íris artificiais na cor marrom apresentaram menores valores de alteração de cor,

estatisticamente significantes (*P*<0,001), em comparação a cor azul. (Tabela 4).

Tabela 2. Valores médios e Desvio Padrão (DP) de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais.

			Período Mensurado					
Cor	**Técnica**	**Desinfetante**	**T_1B**	**NBS**	**T_2B**	**NBS**	**T_3B**	**NBS**
Azul	PE	NES	1,39 (0,20)	1,28	2,26 (0,29)	2,08	3,73 (0,24)	3,43
		OPF	1,43 (0,25)	1,32	2,66 (0,25)	2,45	3,98 (0,22)	3,66
		CHX	1,80 (0,32)	1,66	2,98 (0,37)	2,74	4,48 (0,18)	4,12
		C1	1,32 (0,18)	1,21	2,35 (0,27)	2,17	3,29 (0,23)	3,03
		C2	0,40 (0,12)	0,37	0,42 (0,11)	0,39	0,72 (0,22)	0,66
	CA	NES	1,56 (0,18)	1,44	2,33 (0,20)	2,14	3,90 (0,21)	3,59
		OPF	1,57 (0,17)	1,45	2,53 (0,27)	2,32	4,07 (0,24)	3,75
		CHX	1,74 (0,34)	1,60	2,95 (0,32)	2,71	4,21 (0,32)	3,87
		C1	1,38 (0,23)	1,27	2,24 (0,27)	2,06	3,61 (0,23)	3,33
		C2	0,44 (0,13)	0,41	0,53 (0,18)	0,49	0,75 (0,12)	0,69
	PI	NES	1,68 (0,31)	2,69	2,92 (0,43)	2,69	4,64 (0,21)	4,27
		OPF	1,72 (0,20)	1,58	2,90 (0,19)	2,67	4,09 (0,26)	3,77
		CHX	2,05 (0,26)	1,88	3,36 (0,36)	3,10	4,83 (0,33)	4,44
		C1	1,23 (0,17)	1,14	2,64 (0,21)	2,43	4,13 (0,17)	3,80
		C2	0,52 (0,14)	0,48	0,59 (0,25)	0,54	1,08 (0,28)	1,00
Marrom	PE	NES	0,33 (0,07)	0,31	0,56 (0,10)	0,52	0,70 (0,23)	0,65
		OPF	0,44 (0,08)	0,40	0,62 (0,08)	0,57	0,82 (0,27)	0,75
		CHX	0,42 (0,10)	0,38	0,71 (0,13)	0,65	1,24 (0,20)	1,14
		C1	0,30 (0,07)	0,27	0,46 (0,05)	0,42	0,50 (0,30)	0,46
		C2	0,18 (0,06)	0,17	0,23 (0,06)	0,21	0,37 (0,18)	0,34
	CA	NES	0,36 (0,06)	0,33	0,44 (0,11)	0,41	0,75 (0,15)	0,69
		OPF	0,40 (0,09)	0,37	0,57 (0,08)	0,52	0,97 (0,28)	0,89
		CHX	0,49 (0,11)	0,45	0,80 (0,12)	0,73	1,07 (0,31)	0,99
		C1	0,32 (0,08)	0,29	0,41 (0,06)	0,38	0,76 (0,28)	0,70
		C2	0,25 (0,03)	0,23	0,31 (0,09)	0,29	0,54 (0,25)	0,50
	PI	NES	0,42 (0,08)	0,39	0,67 (0,10)	0,62	1,04 (0,24)	0,96
		OPF	0,44 (0,11)	0,41	0,72 (0,09)	0,66	0,73 (0,20)	0,67
		CHX	0,58 (0,09)	0,53	0,92 (0,14)	0,84	1,26 (0,31)	1,16
		C1	0,39 (0,06)	0,36	0,57 (0,07)	0,53	0,77 (0,12)	0,71
		C2	0,27 (0,05)	0,25	0,31 (0,05)	0,29	0,60 (0,19)	0,55

Tabela 3. Resultados de Análise de Variância (ANOVA) quatro-fatores medidas repetidas.

Fatores	***gl***	**SQ**	**QM**	**F**	***P***
Técnica	2	9,345	4,672	115,113	< 0,001*
Desinfetante	4	243,598	60,899	1500,335	< 0,001*
Cor	1	700,030	700,030	17246,127	< 0,001*
Técnica x Desinfetante	8	2,300	0,288	7,084	< 0,001*
Técnica x Cor	2	2,507	1,254	30,883	< 0,001*
Desinfetante x Cor	4	129,362	32,341	796,751	< 0,001*
Técnica x Desinfetante x Cor	8	0,669	0,084	2,059	0,040*
Entre amostras	270	10,959	0,041		
Período	2	240,093	120,046	2718,375	< 0,001*
Período x Técnica	4	1,556	0,389	8,807	< 0,001*
Período x Desinfetante	8	34,312	4,289	97,121	< 0,001*
Período x Cor	2	102,541	51,271	1160,993	< 0,001*
Período x Técnica x Desinfetante	24	5,493	0,229	5,183	< 0,001*
Período x Técnica x Cor	6	3,338	0,556	12,596	< 0,001*
Período x Desinfetante x Cor	12	151,627	12,636	286,126	< 0,001*
Período x Técnica x Desinfetante x Cor	24	1,360	0,057	1,283	0,164
Intra amotras	540	23,847	0,044		

*P < 0,05 denota diferença estatística significante.

Pode-se verificar na tabela 5 que os botões de íris artificiais tratados com CHX para as duas tonalidades de cor, em todos os períodos mensurados, independente da técnica, apresentaram maiores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (P<0,001), quando comparados com aqueles de ambos os tratamentos controle,

com exceção das amostras tratadas com CHX no período T_1B na cor marrom (ΔE=0,50). Ainda notou-se diferenças significantes (*P*<0,001) de alteração de cor dos botões de íris artificiais na cor azul, tratados com NES e OPF, em comparação aqueles de ambos os tratamentos controle; com exceção do das amostras tratadas com NES no período T_2B (ΔE=2,50) (Tabela 5).

Além disso, para todas as técnicas e períodos mensurados, os botões de íris artificiais tratados com CHX apresentaram maior alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,001) comparados aos respectivos tratamentos controle, independente da tonalidade de cor (Tabela 6). De forma geral as amostras que permaneceram em ambiente seco (C1), ou seja sem tratamento apresentaram maior estabilidade de cor, estatisticamente significante (*P*<0,001), em relação aquelas em ambiente úmido, com ou sem desinfecção (demais tratamentos realizados) (Tabelas 5-6). Na comparação dos botões de íris artificiais entre os diferentes períodos mensurados, pode-se verificar na maioria das amostras, maior alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,001), ao decorrer do tempo de desinfecção e armazenagem das amostras (Tabelas 4-6).

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais para tonalidade de cor, técnica e período, independente do desinfetante utilizado.

		Período		
Cor	**Técnica**	T_1B	T_2B	T_3B
Azul	PE	1,27 (0,52) Aa	2,13 (0,94) Ab	3,24 (1,35) Ac
	CA	1,34 (0,51) ABa	2,11 (0,87) Ab	3,31 (1,33) Ac
	PI	1,44 (0,57) Ba	2,48 (1,03) Bb	3,76 (1,40) Bc
Marrom	PE	0,33 (0,12) Ca	0,52 (0,19) Cb	0,73 (0,38) Cc
	CA	0,36 (0,11) Ca	0,51 (0,19) Ca	0,82 (0,31) CDb
	PI	0,42 (0,13) Ca	0,64 (0,22) Cb	0,88 (0,32) Dc

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais para tonalidade de cor, desinfetante e período, independente do técnica utilizada.

		Período		
Cor	**Desinfetante**	T_1B	T_2B	T_3B
Azul	NES	1,55 (0,26) Aa	2,50 (0,43) ABb	4,09 (0,46) Ac
	OPF	1,57 (0,24) Aa	2,70 (0,28) Bb	4,05 (0,24) Ac
	CHX	1,86 (0,33) Ba	3,10 (0,39) Cb	4,50 (0,38) Bc
	C1	1,31 (0,20) Ca	2,41 (0,30) Ab	3,68 (0,41) Cc
	C2	0,46 (0,13) Da	0,51 (0,20) Da	0,85 (0,27) Db
Marrom	NES	0,37 (0,08) Aa	0,56 (0,14) Aa	0,83 (0,25) Ab
	OPF	0,43 (0,09) ABa	0,64 (0,10) ABb	0,84 (0,26) Ac
	CHX	0,50 (0,12) Aa	0,81 (0,16) Bb	1,19 (0,28) Bc
	C1	0,33 (0,08) ABa	0,48 (0,09) Aab	0,68 (0,27) ACb
	C2	0,23 (0,06) Ba	0,29 (0,08) Ca	0,51 (0,22) Cb

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna (comparação entre desinfetantes para uma mesma tonalidade de cor) e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão de alteração de cor (ΔE) dos botões de íris artificiais para técnica, desinfetante e período, independente da tonalidade de cor.

		Período		
Técnica	**Desinfetante**	T_1B	T_2B	T_3B
PE	NES	0,86 (0,56) ABa	1,41 (0,90) Ab	2,22 (1,57) Ac
	OPF	0,93 (0,54) ABa	1,64 (1,06) ABb	2,40 (1,64) Ac
	CHX	1,11 (0,75) Ba	1,84 (1,19) Bb	2,86 (1,67) Bc
	C1	0,81 (0,54) Aa	1,41 (0,99) Ab	1,90 (1,45) Cc
	C2	0,29 (0,15) Ca	0,33 (0,13) Ca	0,55 (0,26) Da
CA	NES	0,96 (0,63) ABa	1,39 (0,98) Ab	2,33 (1,63) ACc
	OPF	0,99 (0,62) ABa	1,55 (1,02) Ab	2,52 (1,61) ABc
	CHX	1,12 (0,69) Ba	1,87 (1,13) Bb	2,64 (1,64) Bc
	C1	0,85 (0,57) Aa	1,32 (0,96) Ab	2,19 (1,49) Cc
	C2	0,35 (0,13) Ca	0,42 (0,18) Cab	0,64 (0,22) Db
PI	NES	1,05 (0,68) ACa	1,80 (1,19) Ab	2,84 (1,86) Ac
	OPF	1,08 (0,67) ABa	1,81 (1,13) Ab	2,41 (1,74) Bc
	CHX	1,31 (0,78) Ba	2,14 (1,28) Bb	3,04 (1,86) Ac
	C1	0,81 (0,45) Ca	1,61 (1,07) Ab	2,45 (1,73) Bc
	C2	0,40 (0,16) Da	0,45 (0,23) Ca	0,84 (0,34) Cb

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna (comparação entre desinfetantes para uma mesma técnica) e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância (P<0,05), pelo teste de Tukey.

4.6 DISCUSSÃO

A desinfecção de próteses oculares tem como principal objetivo a descontaminação do material, por meio do controle da formação de biofilme sobre a resina acrílica em contato com a conjuntiva. No entanto, é desejável que esse processo não cause danos à estrutura mecânica, química e física desses materiais, tais como alterações de cor da íris estética. A hipótese do estudo foi parcialmente aceita, porque houve diferença na alteração de cor do botão de íris artificial das amostras entre parte dos fatores avaliados. Por outro lado, não houve diferença significante na interação entre todos estes fatores (ANOVA, Tabela 3). Pode-se verificar pelos resultados que a derivada de cor (ΔE) para todas as amostras foi maior que zero, indicando, pela análise espectrofotométrica, alteração de cor (Tabela 2). Alguns estudos apresentam que essa alteração pode ser causada por fatores intrínsecos e extrínsecos[23-26]. Os fatores intrínsecos envolvem a própria descoloração do material, com alteração de sua matiz[24,25]. Fatores extrínsecos como a absorção e adsorção de manchas também podem causar descoloração[23,24,26-28]. Associado a isso, outros fatores são responsáveis pela instabilidade de cor como: acúmulo de manchas, desidratação, absorção de água, infiltração, superfície rugosa, degradação química e pelo uso, oxidação durante as reações duplas de carbono produzindo compostos de peróxido e a contínua formação de pigmentos devido à degradação de produtos[28-32].

Pode-se verificar para a cor azul, que a técnica PE apresentou menores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (*P*<0,001), em relação à técnica PI. No entanto não houve diferença significante (*P*>0,05) entre as técnicas na cor marrom (Tabela 4). De acordo com o fabricante, as calotas oculares, são confeccionadas com resina termopolimerizável, incluída em moldes de aço e aquecida, com temperatura e tempo não informados, sem adição de monômeros. A obtenção de polímeros por este método tem como principal desvantagem maior absorção de água ao logo do tempo, alterando as características físicas do mesmo. Desse modo, a ação da água, proporcionada pela armazenagem e desinfecção, provavelmente proporcionou alteração das ligações químicas dos polímeros[30,32] que compõem as calotas pré-fabricadas, degradando-o, refletindo diretamente na estabilidade de cor das amostras. Com estes resultados, a alteração de cor do botão de íris artificial na cor azul pode ter sido reflexo tanto da degradação da resina incolor da calota ocular bem como da tinta selecionada para a pintura da íris artificial. Ainda os botões de íris artificiais na cor marrom apresentaram menores valores de alteração de cor (*P*<0,001), em comparação a cor azul. (Tabela 4). É conhecido que os pigmentos escuros tais como preto e marrom podem apresentar melhor estabilidade de cor frente a degradação da luz UV. Assim as cores claras podem refletir a radiação que incidem sobre elas, enquanto que as cores escuras a absorvem[13-15]. Este fato associado ao conteúdo de possíveis impurezas na composição do pigmento azul podem ter contribuído a alteração de suas propriedades físico-químicas

ao longo do processo de desinfecção e armazenagem. Além disso, diante do fato que no botão de íris artificial obtido pela técnica PI foi realizado a pintura direta sobre a base da calota pode-se supor que a tinta tenha liberado resíduo ou permitido a evaporação de solventes orgânicos voláteis, mais facilmente em relação às outras técnicas e tonalidade de cor da íris artificial, em contato com calor e umidade.

Poucos são os estudos[11-13,15] sobre a alteração de cor de íris artificial, em longo prazo e após imersão em soluções químicas desinfetantes. No presente estudo observou-se aumento significativo (P<0,001) nos valores médios de valores de alteração de cor do botão de íris artificial das amostras durante o período de desinfecção e armazenagem, para ambas as cores e técnicas de confecção (Tabelas 2,4-6). Este fato pode ser mais bem observado ao verificar que as amostras com tratamento controle a seco, apresentaram de forma geral, menores valores de alteração de cor, estatisticamente significante (P<0,001) em relação aquelas tratadas com outros desinfetantes e em ambiente úmido (Tabelas 5-6), indicando que provavelmente a associação de calor e humidade, proporcionados pela armazenagem e processo de desinfecção pode ter ocasionado à degradação do polímero. Essas moléculas de água penetram na massa de resina acrílica e ocupam posições entre as cadeias poliméricas separando-as, causando ligeira expansão da massa de resina polimerizada e interferindo no entrelaçamento da cadeia polimérica. Além disso, a maioria dos polímeros possuírem em suas cadeias moleculares grupos funcionais

que absorvem luz ultravioleta, a qual leva a estrutura a um estado mais instável[29,30]. Se a molécula excitada dispersar o excesso de energia por algum meio, haverá um rompimento, isto é, a degradação fotoquímica e esses fatores concorrem concomitantemente para o aparecimento de deterioração tais como perda de cor ou brilho[11-15,25-27,33], perda de opacidade[34], aparecimento de trincas [15,35] entre outros.

Além disso, as soluções desinfetantes empregadas neste estudo são aquosas com compostos químico específicos ao seu princípio ativo, que podem causar a dissolução ou deformação da resina, tais como álcool e fenol[32,35]. Estes compostos provavelmente foram absorvidos e causaram amolecimento da camada mais superficial da resina incolor. Neste estudo pode-se também observar que os botões de íris artificiais tratados com CHX apresentaram maior alteração de cor, estatisticamente significante (P<0,001) comparados aos respectivos tratamentos controle (Tabelas 5-6). É bem conhecido que a clorexidina age por saturação, e é recomendada para desinfecção de materiais por ser praticamente atóxica, além de não ser poluente, não exalar gases e não irritar a pele e as mucosas. Neste estudo, os maiores valores de alteração de cor relacionada ao uso da clorexidina pode ser devido à elevada concentração (4%) desta solução utilizada com lenta absorção do produto na resina ao longo do tempo de armazenagem com desinfecção, resultando em mudanças estruturais no polímero. Alguns estudos também relatam a presença do pigmento amarelo em sua

formulação[35,36], que pode ter sido responsável pela alteração de cor da resina acrílica translúcida a visualização da íris artificial.

De acodo com os parâmetros estabelecidos NBS[21] um $\Delta E \leq 3,3$ é considerado clinicamente aceitável. Na observação destes conceitos, foi verificado neste estudo que o botão de íris artificial de todas as amostras na cor marrom apresentou alteração de cor clinicamente aceitável, o que não ocorreu para as amostras na cor azul no período T_3B (Tabela 2). Entretanto, deve ser ressaltado que no presente estudo, a desinfecção e armazenagem foram realizadas por um periodo de 240 dias, o que é considerado inferior ao que geralmente ocorre na atualidade de uso pelo paciente; onde a troca de prótese ocular ocorre a cada 3 a 5 anos. Assim, considerando a tendencia do aumento de cor observado neste estudo, pode-se inferir para a cor azul, que a situação clínica de alteração de cor da íris artificial estética pode alcançar valores clinicamente inaceitáveis ao decorrer do tempo de uso pelo paciente.

A escolha das condições experimentais neste estudo considerou a adaptação da prótese ocular aos tecidos subjacentes pelo paciente dentro do primeiro ano de uso após sua confecção. Ainda há uma grande população de pacientes com próteses oculopalpebrais e até mesmo pacientes que receberam transplantes de córnea que ainda requerem lentes de contato protéticas. Por isso a estética da íris artificial, em relação à alteração de cor, torna-se entre outros, o mais importante fator de aceitação da reabilitação facial.

4.7 CONCLUSÃO

- ✓ As amostras com botões de íris artificiais na cor azul confeccionadas pelas técnicas convencional e com calota pré-fabricada apresentaram maior estabilidade de cor.
- ✓ Os botões de íris artificiais de cor marrom apresentaram menor alteração de cor.
- ✓ A desinfecção com clorexidina e o período de armazenagem influenciaram a estabilidade de cor dos botões de íris artificiais em longo prazo.

4.8 REFERÊNCIAS

1. Huber H, Studer SP. Materials and techniques in maxillofacial prosthodontic rehabilitation. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2002;14(1):73-93.
2. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Haddad MF, Pesqueira AA. Turcio KHL. An alternate impression technique for ocular prostheses. J Prosthodont 2013;22(4):338-40.
3. Hatamleh MM, Haylock C, Watson J, Watts DC. Maxillofacial prosthetic rehabilitation in the UK: a survey of maxillofacial prosthetists' and technologists' attitudes and opinions. Int J Oral Maxillofac Surg 2010;39(12):1186-92.
4. Goiato MC, Haddad MF, dos Santos DM, Pesqueira AA, Filho HG, Pellizzer EP. Incidents malignant neoplasias maxillofacial area. J Craniofac Surg 2009;20(4):1210-3.
5. Goiato MC, Santos DM, Bannwart LC, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF, Santos EG. Psychosocial impact on anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. Int J Oral Maxillofac Surg 2013;42(1):113-9.
6. Dyer NA. The artificial eye. Aust J Ophthalmol 1980;8(4):325-7.
7. Taicher S, Steinberg HM, Tubiana I, Sela M. Modified stock-eye ocular prosthesis. J Prosthet Dent 1985;54(1):95-8.

8. Reitemeier B, Notni G, Heinze M, Schone C, Schmidt A, Fichtner D. Optical modeling of extraoral defects. J Prosthet Dent 2004;91(1):80-4.
9. Goiato MC, Bannwart LC, Haddad MF, Dos Santos DM, Pesqueira AA, Miyahara GI. Fabrication techniques for ocular prostheses - an overview. Orbit 2014;33(3):229-33.
10. Artopoulou II, Montgomery PC, Wesley PJ, Lemon JC. Digital imaging in the fabrication of ocular prostheses. J Prosthet Dent 2006;95(4):327-30.
11. Reis RC, Dias RB, Carvalho JCM. Evaluation of Iris Color Stability in Ocular Prosthesis. Braz Dent J 2008;19(4):370-4.
12. Goiato MC, Moreno A, dos Santos DM, de Carvalho Dekon SF, Pellizzer EP, Pesqueira AA. Effect of polymerization and accelerated aging on iris color stability of ocular prosthesis. Cont Lens Anterior Eye 2010;33(5):215-8.
13. Goiato MC, Fernandes AÚ, dos Santos DM, Hadadd MF, Moreno A, Pesqueira AA. Alteration of blue pigment in artificial iris in ocular prosthesis: effect of paint, drying method and artificial aging. Cont Lens Anterior Eye 2011;34(1):22-5.
14. Fernandes AU, Goiato MC, Batista MA, Santos DM. Color alteration of the paint used for iris painting in ocular prostheses. Braz Oral Res 2009;23(4):386-92.

15. Moreno A, Goiato MC, Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Influence of different disinfecting solutions on the color change of artificial irises used in ocular prostheses. Color Research and Application 2014;39(1):56-62.
16. Lai CP, Tsai MH, Chen M, Chang HS, Tay HH. Morphology and properties of denture acrylic resins cured by microwave energy and conventional water bath. Dent Mat 2004;20(2):133-41.
17. Powers JM, Sakaguchi RL. Prosthetic Applications of Polymers. In: Craig RG, editor. Craig's restorative dental materials. St. Louis: Elsevier; 2002. p 635-690.
18. Polyzois GL, Yannikakis SA, Zissis AJ, Demetriou PP. Color changes of denture base materials after disinfection and sterilization immersion. Int J Prosthodont 1997;10(1):83-9.
19. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. J Prosthet Dent 2005;93(2):171-6.
20. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. J Prosthet Dent. 2009;101(3):205-13.
21. Nimeroff I. Colorimetry. Natl Bureau Stand Monogr 1968;104:4-32.
22. Paranhos RMZF, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SCH, Ito IY, Mattos MGC. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and

anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. J Appl Oral Sci 2007;15(1):33-8.

23. Lee YK, Lim BS, Kim CW. Influence of illuminating and viewing aperture size on the color of dental resin composites. Dent Mater 2004;20(2):116-23.
24. Jin C, Nikawa H, Makihira S, Hamada T, Furukawa M, Murata H. Changes in surface roughness and colour stability of soft denture lining materials caused by denture cleansers. J Oral Rehabil 2003;30(2):125-30.
25. Villalta P, Lu H, Okte Z, Garcia-Godoy F, Powers JM. Effects of staining and bleaching on color change of dental composite resins. J Prosthet Dent 2006;95(2):137-42.
26. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. J Prosthet Dent 2009;101(3):205-13.
27. Goiato MC, Souza JF, Santos DM, Moreno A, Pesqueira AA. Chromatic stability of acrylic resins of artificial eyes submitted to the accelerated aging and polishing. J Appl Oral Sci 2010;18(6):641-5.
28. Canadas MD, Garcia LF, Consani S, Pires-de-Souza FC. Color stability, surface roughness, and surface porosity of acrylic resins for eye sclera polymerized by different heat sources. J Prosthodont 2010;19(1):52-7.

29. Powers JM, Sakaguchi RL. Optical, Thermal, and Electrical Properties. In: Craig RG, editor. Craig's restorative dental materials. 11st ed. St. Louis: Elsevier; 2002. p 38-66.
30. Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental. 12nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Publisher; 2013. 592p.
31. Jin C, Nikawa H, Makihira S, Hamada T, Furukawa M, Murata H. Changes in surface roughness and colour stability of soft denture lining materials caused by denture cleansers. J Oral Rehabil 2003;30(2):125-30.
32. Ma T, Johnson GH, Gordon GE. Effects of chemical disinfectants on the surface characteristics and color of denture resins. J Prosthet Dent 1997;77(2):197-204.
33. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. J Prosthet Dent 2009;101(3):205-13.
34. Fernandes AU, Goiato MC, dos Santos DM. Effect of weathering and thickness on the opacity of acrylic resin and ocular button for artificial eyes. J Craniofac Surg 2010;21(1):64-7.
35. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. J Prosthet Dent 1992;68(1):191-5.

36. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polimerized acrilic resins after disinfection and long-term water immersion. J Prosthet Dent 2005;93(2):171-6.

ANEXOS

ANEXO A – Normas das revistas selecionadas para a publicação dos artigos

CAPÍTULO 1

JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B: APPLIED BIOMATERIALS

Aims and Scope

Journal of Biomedical Materials Research Part B: *Applied Biomaterials* is anofficial journal of the Society for Biomaterials, the Japanese Society forBiomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the KoreanSociety for Biomaterials. It is a peer-reviewed journals serving the needs ofbiomaterials professionals who devise, promote, apply , regulate produce, andmarket new biomaterials and medical devices. Papers are published on devicedevelopment, implant retrieval and analysis, manufacturing, regulation ofdevices, liability and legal issues, standards, reviews of different deviceareas, and clinical applications. Published manuscript fit into one of sixcategories: original research reports, clinical device-related articles, shortresearch and development reports, review, special report, or columns andeditorials. Manuscripts from all countries are invited but must be in English. Authors are not required to be members of a Society for Biomaterials.

Types of Articles Considered for Publication

Original Research Reports: Full-length papers consisting of complete anddetailed descriptions of a research problem, the experimental approach, thefindings, and appropriate discussion. Findings should represent significantnew additions to knowledge.

Clinical Device-Related Articles: Full-length papers addressingsuch issues as material processing, device construction, regulatorymatters, clinical trials, and device retrieval.

Reviews: Scholarly and critical topic-oriented reviews thatpresent a state-of-the-art view. While most reviews are solicited, personsinterested in contributing may contact the Editor.

Special Reports: Reports of special topic-oriented symposia,deviceretrieval protocols, or other special reports not described in the abovecategories, yet of interest to the applied biomaterials research anddevelopment community. Potential contributors should contact the Editor beforesubmitting special reports.

Columns and Editorials: While columns and guest editorials arepreponderantly solicited, persons interested in becoming columnists orcontributing editorials are encouraged to contact the Editor.

Submission of Manuscripts

Online Submission: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* is now receiving submitted manuscripts online at http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b.

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go tohttp://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b. Check for an existing user account. Ifyou are submitting for the first time, and you do not find an existingaccount, create a new account. Follow all instructions.

At the end of a successful submission, a confirmation screen withmanuscript number will appear and you will receive an e-mail

confirming thatthe manuscript has been received by the journal. If this does nothappen,please check your submission and/or contact tech support using the GetHelp Now link in the right corner of any screen.

Upon Acceptance: Manuscript files will now automatically be sentto the publisher for production. It is imperative that files be in the correctformat to avoid a delay in the production schedule.

JBMR Part B has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to theirsubmitted articles. The Editorial Board asks authors of original reports andreviews to disclose, at the time of submission: (1) any financial oremployment arrangements they may have with a company whose product figuresprominently in the submitted manuscript or with a company making a competitiveproduct; and (2) any grants or contracts from a government agency, a nonprofitfoundation, or a company supporting the preparation of the manuscript or thedescribed research. This information will be available to the reviewers of themanuscript. If the article is accepted for publication, the editor willdiscuss with the authors the manner in which such information may becommunicated to the reader.

At the time of submission, *JBMR Part B* asks authors to certify that all animals utilized in their research were cared for according to thepolicies and principles established by the Animal Welfare Act and the NIHGuide for Care and Use of Laboratory Animals.

Review Process: All original reports and reviews receive criticalreview by at least two reviewers with expertise in the major subject area ofthe paper. Reviewers may recommend "Acceptance as is," "Acceptance withmodification," or "Rejection." If modification is required, the manuscript isreturned to the author(s). The revised manuscript is then re-reviewed by

theoriginal reviewers, and even re-revised if necessary. Differences in opinionare resolved by submission either to a third reviewer or the Editor.

Copyright/Licensing

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

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

For authors choosing OnlineOpen: If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA): Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.aspand visit http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license

supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: http://www.wiley.com/go/funderstatement.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license: Creative Commons Attribution License OAA To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit

http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html.

Organization and File Formats

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. The results and discussion sections must be written separately and cannot be combined. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according tot the Journal design specifications. Do notuse desktop publishing software such as PageMaker orQuark Xpress or other software such as Latex. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files;the

system will automatically create a pdf file of your paper for thereviewers.

Original research and short reports should appear in the followingorder:title page (including authors and affiliations), abstract,keywords,introduction, materials and methods, results, discussion,acknowledgments,references, figure legends. Number pages consecutivelystarting with the titlepage as page 1. Abbreviations must conform to thoselisted in Council ofBiology Editors' CBE Style Manual, 5th Edition.

When mentioning a material, chemical reagent, instrument, orotherproduct, use the generic name only. If further identification(proprietaryname, manufacturer's name and address) is absolutely required,list it inparentheses.

Title Page: List the full title of the paper andeachauthor's full name (first name, middle initial(s), surname),department,institution, city, and state (and country if other than the UnitedStates).Indicate the name and address of the author to whom reprint requests should besent.

Abstract and Keywords: Include an abstract of about200words maximum summarizing the aims, findings, and conclusions of thepaper.Below the abstract, list five keywords or phrases that best characterizethesubject matter of the manuscript.

Running Heads: Supply a short title of no more than65characters, including spaces and punctuations, to be used for runningheadcopy.

References: Number references consecutively as they appear in the text.Materialaccepted for publication but not yet published may be listed intheReferences, but unpublished observations, personal

communications,andmaterial submitted for publication but not yet accepted should becitedparenthetically within the text (and not included among thenumberedreferences). Style references entries using the Council of Biology Editors Style Manual, 5th Edition formats: *For journal articles:* Alexander A, Green WS. Total hip replacements: A second look. JSocBiomater 1989;45:345–366. *For books/chapters:* Ricci JL, Guichet J-M. Total hip replacement: A third look.CindraAB, Franklin DE, editors. State of the art orthopaedics, vol 3, Hips.NewYork: Wiley;1988:56–59. *For abstracts:* Davidson GRH. Total hip replacement: A fifth look. TransABCS1987;22-341–345. *For presentations:* Goodenough T. Total hip replacement: A sixth look. Presented atthe3rd Annu Mtg Orthop Res Soc, Boston, December 5–7, 1989.

Figure Legends: Please supply complete captions for allfigures.Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers andtitlesfor all. All table columns should have an explanatory heading. Tablesshould besubmitted as doc or rtf files (it is preferred that tables areprepared usingWord's table edit tool.)

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution:

The minimum requirements for resolution are: 1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs. 300 DPI/PPI for picture-only photographs 600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements,i.e.,text labels, thin lines, arrows. These resolutions refer to the output size of the file; if youanticipatethat your images will be enlarged or reduced, resolutions should beadjustedaccordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG filesareacceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will berequired.For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color;upon revision, CMYK color will be required. Delivery ofproduction-qualityfiles early in the review process may facilitate smooth andrapid publicationonce a manuscript has been accepted.

Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG,GIF,ONG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphicsinPhotoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into yourpageapplications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures asJPEGsand convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figurefiles, authors are encouraged to visit http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp.

To ensure that your digital graphics are suitable for printpurposes,please go to RapidInspector™ at http://rapidinspector.cadmus.com/zwi/index.jsp. Thisfree,stand-alone software application will help you to inspect andverifyillustrations right on your computer.

A legend must be provided for each illustration and must defineallabbreviations used therein. Legends should be placed at the end ofthemanuscript text file.

Color Illustrations: Color figures are generally printedinthe Journal at the author's expense. The published will provide costestimatesprior to printing. A limited number of color figures that are ofcriticalimportance and that significantly enhance the presentation will beconsideredfor publication at the publisher's expense subject toeditorialrecommendation. Final decision on publication of color figures willbe at thediscretion of the Editor. All color figures will be reproduced infull colorin the online edition of the journal at no cost to authors. Forbestreproduction, bright, clear colors should be

used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images againstawhite background wherever possible.

Reprints: Reprints may be ordered at https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=JEMB.

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

CAPÍTULOS 2 e 3

JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS

About the Journal of Biomedical Optics

The Journal of Biomedical Optics (JBO) is a print and online journal that publishes peer-reviewed papers on the use of modern optical technology for improved health care and biomedical research.

The journal publishes full-length research papers, letters, opinions, outlooks, tutorials, and reviews. In addition to contributed research articles, JBO often publishes special sections in key areas of technology. Special sections are assembled by guest editors. See the Editorial

Schedule for a list of forthcoming special section topics and dates. To view a list of previously published special sections, see Past Special Sections.

Authors should read the journal policies prior to submission to ensure their manuscript meets the journal requirements. This page will also provide information about submitting a proceedings manuscript to the journal.

Authors are required to include a cover letter with their submission explaining the significance and novelty of the work, the problem that is being addressed, and why the manuscript belongs in this journal.

Why publish in this journal?

JBO is a highly ranked journal focused on the applications of emerging technologies in lasers, optoelectronic devices, fiber optics, sensors, and imaging to medical research, diagnostics, and therapy. JBO's impact factor has consistently ranked in the top 10 in the optics category since 2001.

Author benefits:

- Online-first publication of articles
- Established and competitive impact factor
- Professional copyediting and typesetting
- Rapid review and publication
- Free online color figures
- Multimedia integration
- 5 free downloads for authors from the SPIE Digital Library
- Open access publication at a low competitive cost
- NIH-funded articles are deposited into PubMed Central (PMC) at no charge, with full-text access available one year after publication.
- Delayed open access after one year to all authors who pay the voluntary page charges in full.

- Abstracting and indexing in leading scientific databases, including Index Medicus/MEDLINE; Science Citation Index; Current Contents/Life Sciences; Current Contents/Engineering, Computers & Technology; Inspec; Scopus; Ei Compendex; and Chemical Abstracts

Submit a manuscript

Journal of Biomedical Optics uses an online submission system.

Authors should read and follow the instructions on how to prepare and format a manuscript prior to submission.

Manuscript Types

Letter: A short technical communication of significant interest intended for rapid publication in the JBO Letters section of the journal. The manuscript length may not exceed three printed journal pages. Further details below.

Regular Paper: A full-length manuscript presenting original work intended as a regular contribution to the journal.

Special Section Paper: A full-length manuscript presenting original work intended for submission to a special topical section organized by a guest editor.

Review Paper: An article reviewing a particular topic or field. Review papers are typically invited papers written by a highly regarded expert in the field.

Technical Note: A concise description of a software package, instrument, chemical, or procedure that provides a solution to a specific problem and

has sufficient value to many readers of JBO. The Note length may not exceed five printed journal pages.

Tutorial: A tutorial is an introductory and systematic description of a technology or a research topic. Tutorials should be accessible to general readers of JBO and may include homework problems.

Outlook: A visionary type of paper that takes a speculative look at where a technology or a research area might be heading. Of particular interest are the prospects in the next 5-15 years. Outlook papers should include a brief overview followed by predictions for the future and may occupy 5-10 printed pages in the journal. Potential authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief before writing the manuscript.

Opinion: A description of opinions on a topic of general interest to the readers of JBO. Potential authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief before writing the manuscript.

ANEXO B – Ilustrações da fase laboratorial da metodologia experimental.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Figura 1. Materiais odontológicos utilizados no estudo: resinas acrílicas termopolimerizáveis (N1 para esclera artificial e incolor); adesivo líquido J-350 e calotas oculares.

Figura 2. Cepas utilizadas no estudo: *S. epidermidis* e *S. aureus*.

Figura 3. Materiais de microbiologia utilizados no estudo: solução de água destilada estéril; meio de cultura BHI; e glucose.

Figura 4. Desinfetantes utilizados no estudo: sabão neutro, Opti-Free, Efferdent e gluconato de clorexidina.

Figura 5. Forno microondas com 1400 W (BC 30 LTS Maxi; Brastemp, São Paulo, SP,Brasil).

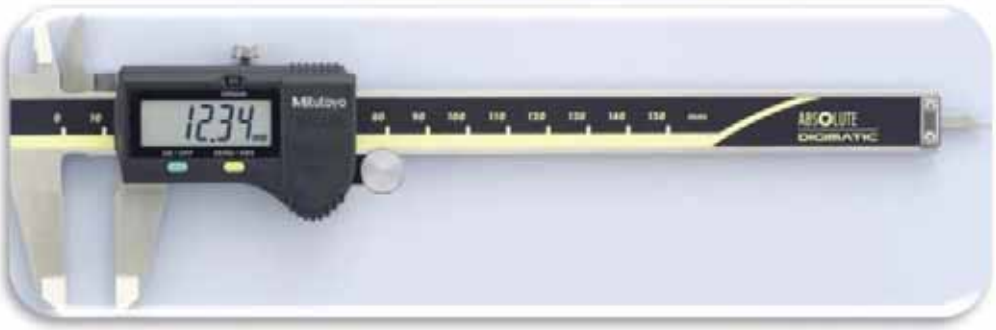


Figura 6. Paquímetro digital (500-171-20B; Mitutoyo, Tóquio, Japão).

Figura 7. Politriz automática: http://www.buehler.com (Ecomet 300PRO; Buehler, Illinois, EUA).

Figura 8. Estufa bacteriológica digital (CE-150/280I; CIENLAB Equipamentos Científicos Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil).

Figura 9. Microscópio eletrônico de Varredura: http://www.jeol.co.jp (JSM 610LA; JEOL, Tóquio, Japão).

Figura 10. Goniômetro: http://www.ramehart.com (Ramé-Hart 100-00; Ramé-Hart Instrument Co., Alemanha).

Figura 11. Espectrofotômetro ultravioleta visível (Evolution 60S; Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

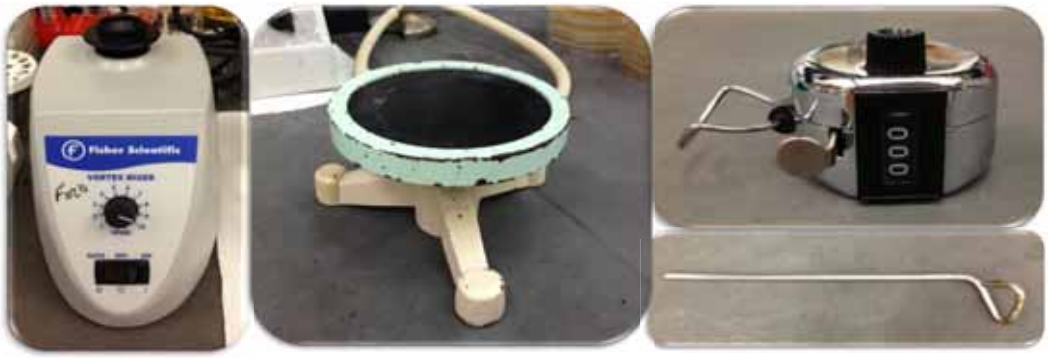


Figura 12. Aparelhos e instrumentos utilizados para a obtenção da contagem de bactérias: vortex mixer (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), mesa para espalhamento de bactéria, contador de colônias (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e espátula de Drigalsky.

Figura 13. Incubadora (C24 Incubator Shaker; Edison, NJ, EUA).

Figura 14: Espectrofotômetro de reflexão ultravioleta visível (UV-2450; Shimadzu Corp, Kyoto, Japão).

Figura 15. Dispositivo para padronizar a área de leitura de cor das amostras.

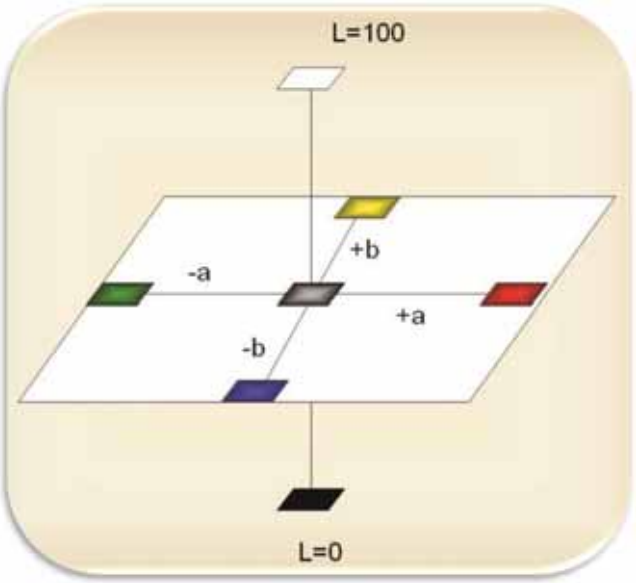


Figura 16. Desenho esquemático representativo do Sistema CIE L*a*b*.

METODOLOGIA – CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS – CAPÍTULO 1

Figura 17. Vista superior da matriz metálica preenchida com cera 7 e união do conjunto (matriz metálica e placa de vidro) com silicone de condensação extra-duro.

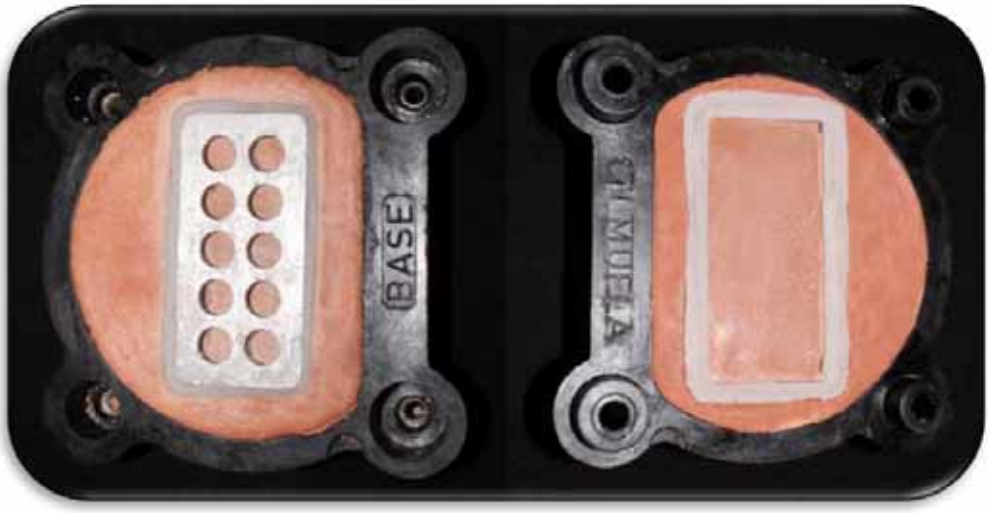


Figura 18. Conjunto (matriz metálica e placa de vidro) incluídos na base na mufla e placa de vidro incluído na contra mufla.

Figura 19. Monômero e polímero da resina acrílica N1 devidamente proporcionados e vertidos no pote de vidro para manipulação de resina.

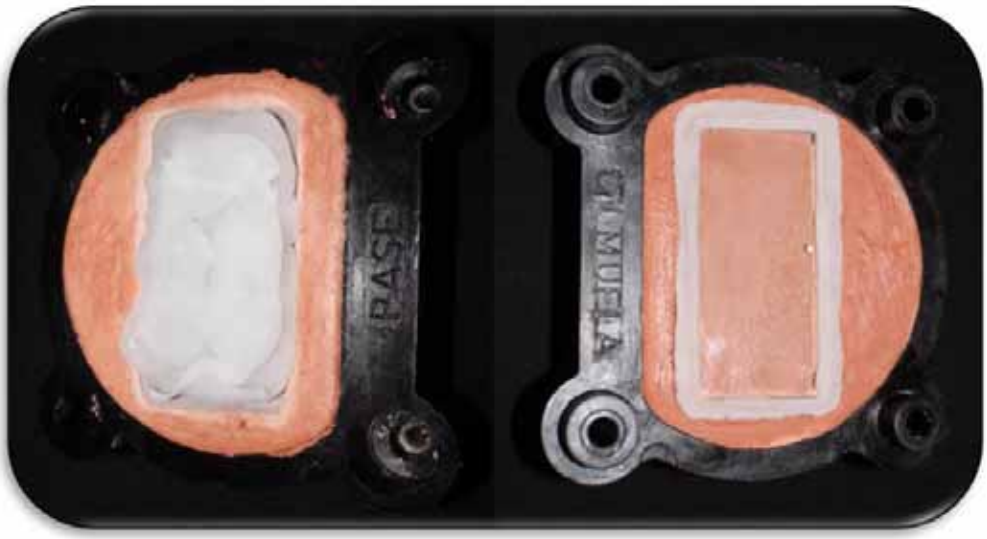


Figura 20. Inserção da resina acrílica no interior dos círculos vazados da matriz incluída na base da mufla.

Figura 21. Prensagem e polimerização da resina acrílica N1.

Figura 22. Etapas finais de confecção das amostras em resina acrílica: acabamento das amostras com fresa maxicute, amostras finalizadas após polimento e esterilizadas.

METODOLOGIA – CULTURA, DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME E CONTAGEM DAS CÉLULAS – CAPÍTULO 1

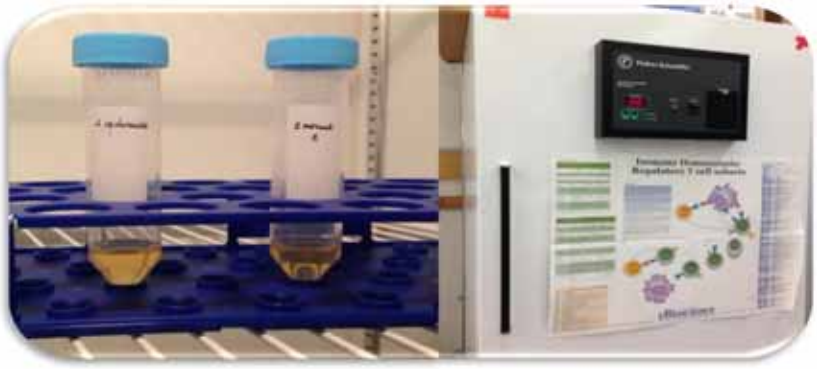


Figura 23. Culturas de *Staphylococcus* spp inicadas em BHI e mantidas em crescimento a 37°C.

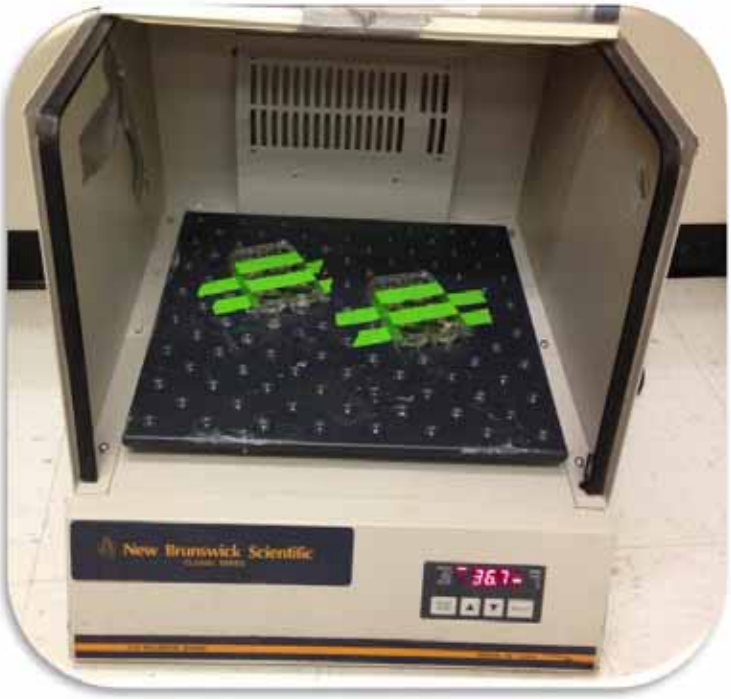


Figura 24. Amostras em meio de cultura inoculado com *Staphylococcus* spp e mantidas sob agitação para desenvolvimento do biofilme.

Figura 25. Amostras colocadas em uma nova placa de seis poços com troca do meio de cultura após 24 horas de desenvolvimento do biofilme.

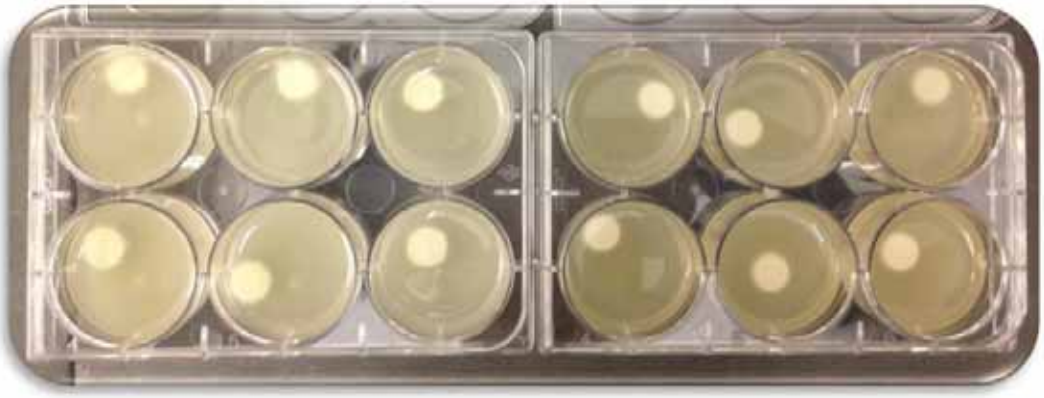


Figura 26. Amostras imersas no meio de cultura inoculado com S. epidermidis após 72 horas de desenvolvimento do biofilme; e amostras imersas no meio de cultura inoculado com S. aureus após 72 horas de desenvolvimento do biofilme.

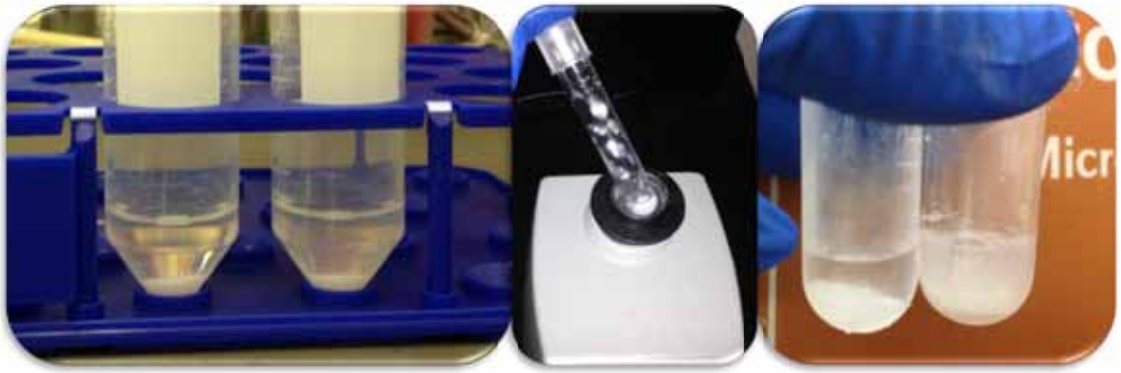


Figura 27. Desinfecção das amostras após desenvolvimento do biofilme; desprendimento do biofilme por vortex e visualização de dois tubos falcão antes e após agitação.

Figura 28. Processo de espalhamento da bactéria na placa petri: remoção de 100 microlitros de solução do ependorf, em seguida infiltração desta alíquota na placa petri e espalhamentodo desta com espátula flamblada.

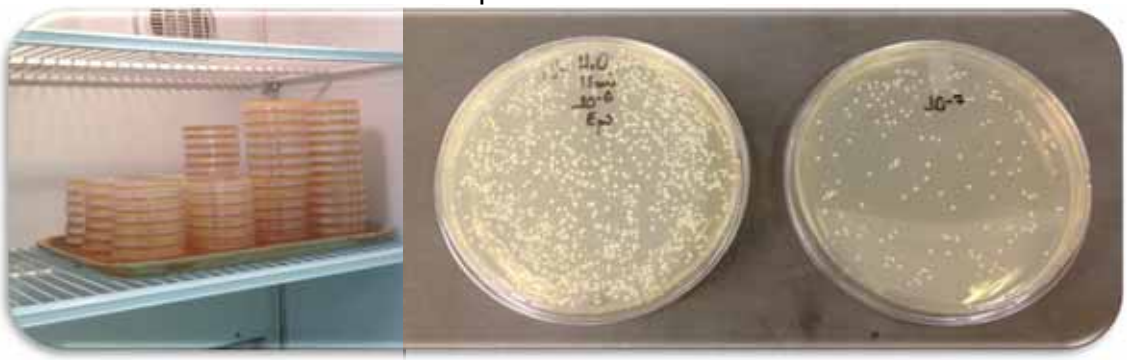


Figura 29. Placas Petri incubadas a 37°C por 24 horas, e após isso contagem do número de colônias formadas por mililitro.

METODOLOGIA – CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS – CAPÍTULOS 2 E 3

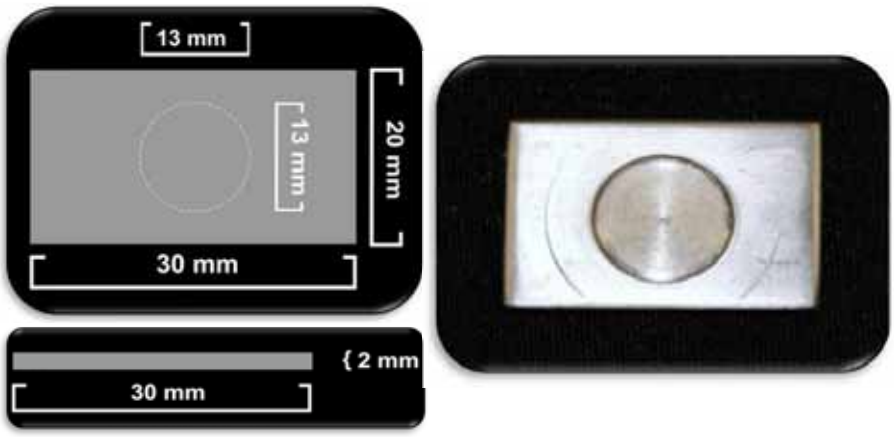


Figura 30. Desenho esquemático da matriz metálica com suas dimensões e vista superior da mesma.

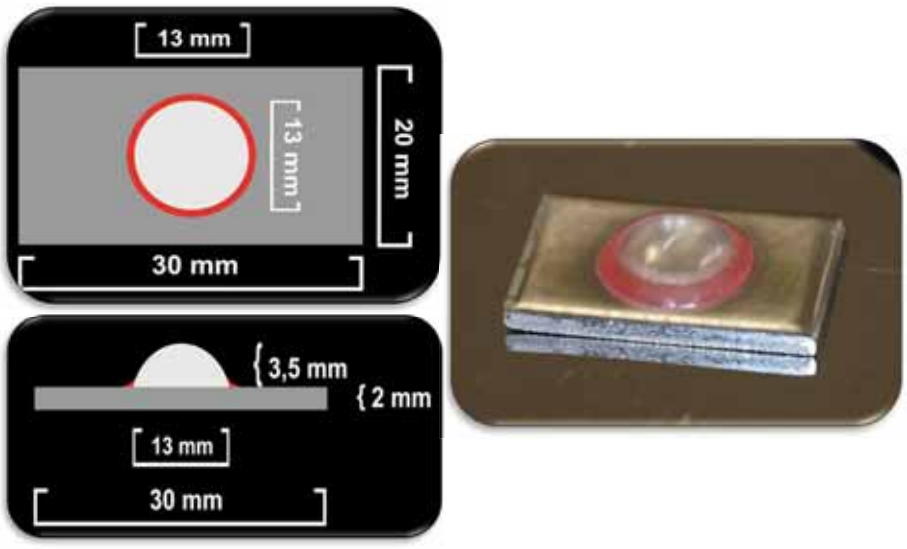


Figura 31. Desenho esquemático da matriz metálica com a calota em posição centralizada e vista lateral da mesma.

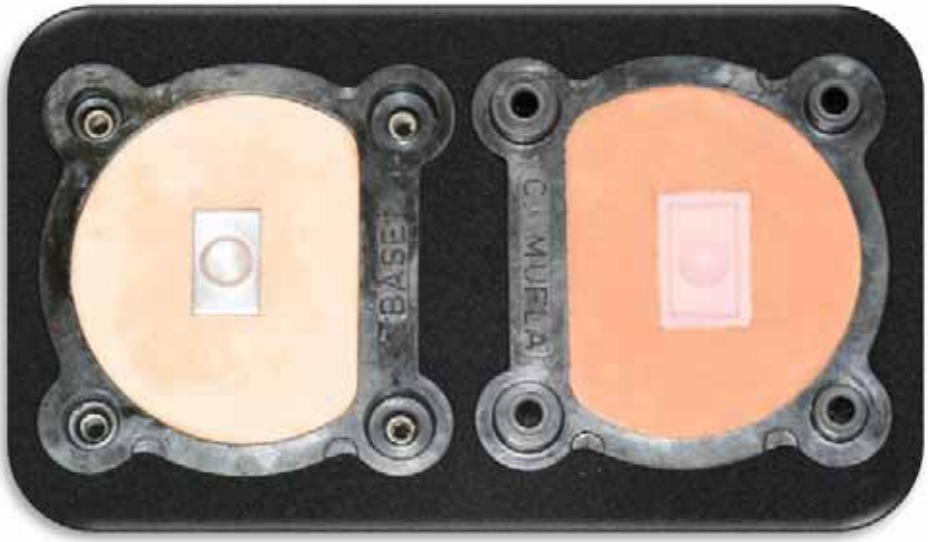


Figura 32. Conjunto (matriz metálica e calota incolor) incluídos em mufla para obtenção de moldes de silicone.

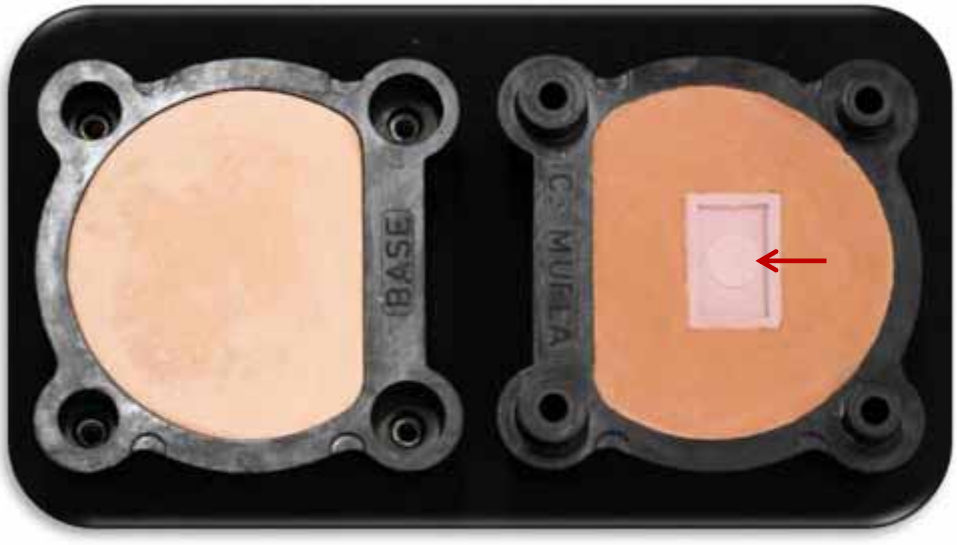


Figura 33. Preenchimento da região (seta) corresponde à calota no molde de silicone.

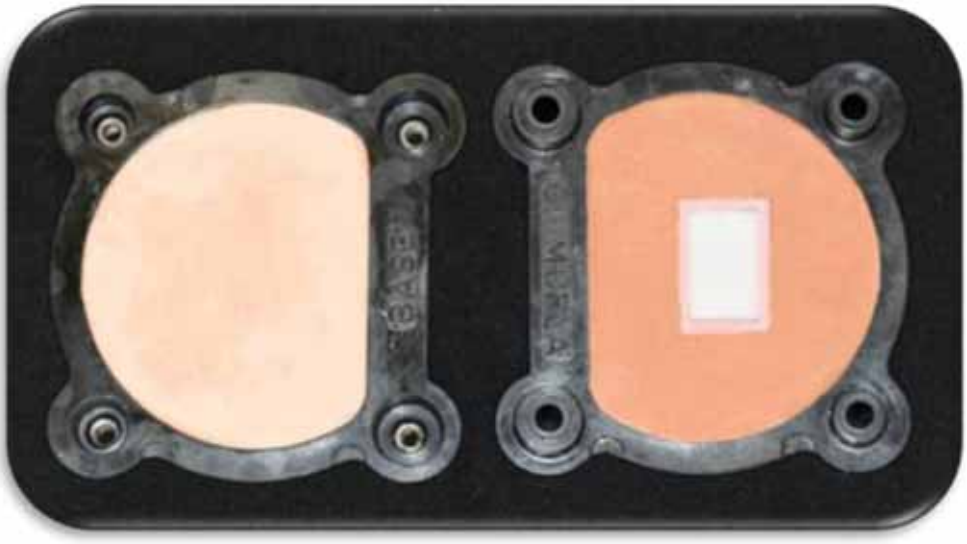


Figura 34. Preenchimento do molde com resina acrílica N1.

Figura 35. Blocos de resina acrílica termopolimerizável N1 após polimerização.

Figura 36. Íris artificiais e calotas oculares pintadas.

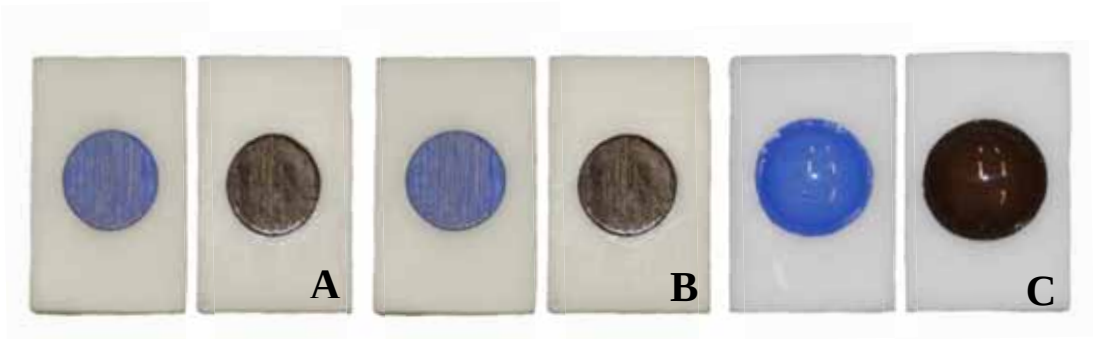


Figura 37. Obtenção das amostras nas técnicas de confecção do botão de íris artificial antes da polimerização da resina acrílica incolor: técnica convencional na íris cor azul e marrom - PE (A); técnica com calota pré-fabricada - CA (B); técnica da pintura invertida – PI (C).

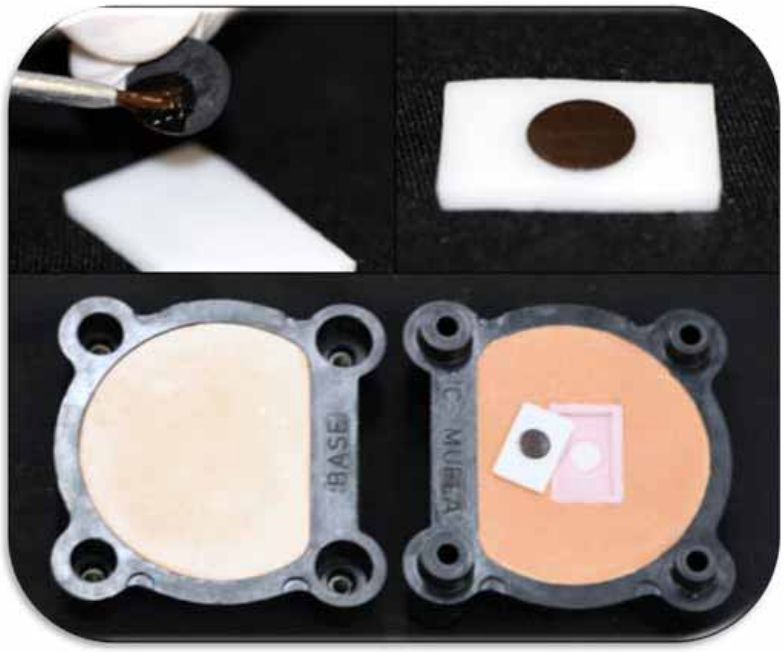


Figura 38. Discos de cartolina pintados e fixados com adesivo no centro da placa de resina acrílica N1. Prensagem da resina acrílica incolor sobre a pintura do disco em papel (PE).

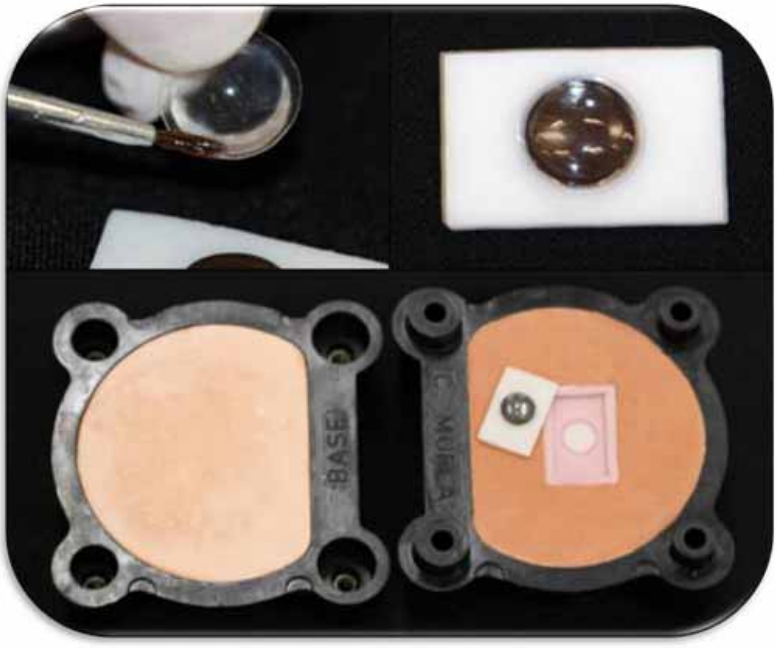


Figura 39. Fixação da pintura dos discos de cartolina na base das calotas oculares; e posicionamento deste conjunto (disco e calota) no centro da placa de resina acrílica N1. Prensagem da resina acrílica incolor sobre a calota ocular (CA).

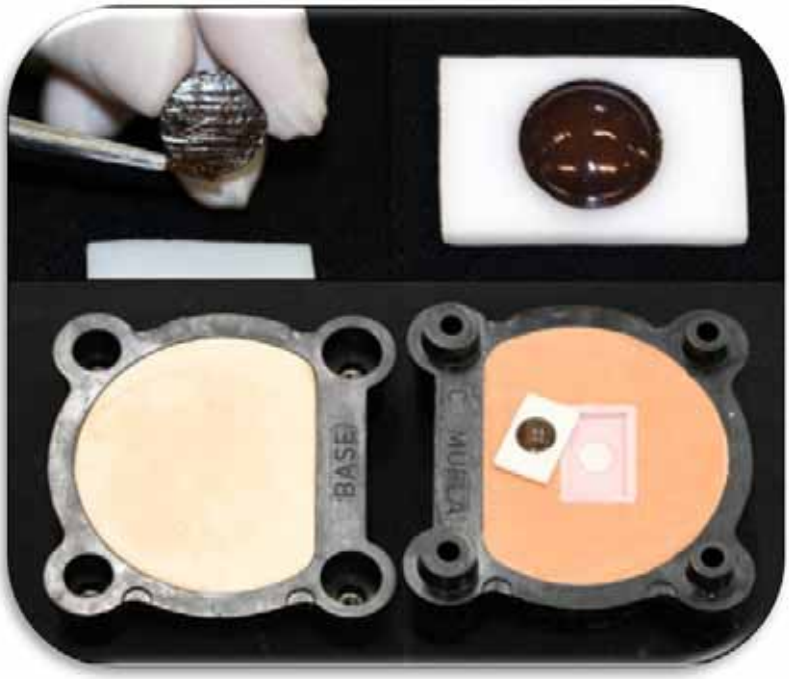


Figura 40. Fixação das bases das calotas oculares pintadas no centro da placa de resina acrílica N1. Prensagem da resina acrílica incolor sobre a calota ocular (PI).

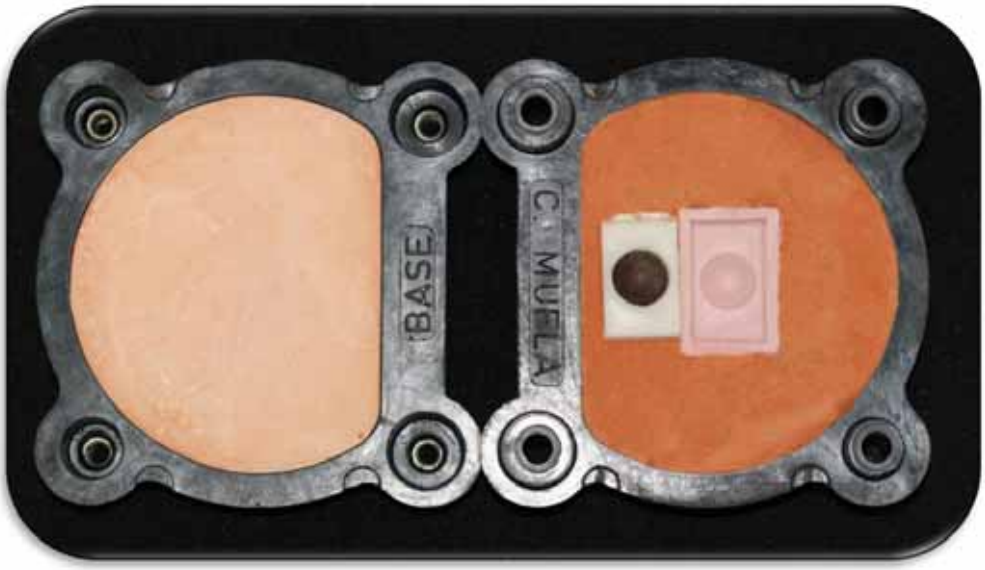


Figura 41. Desinclusão da mufla após prensagem e polimerização da resina incolor.

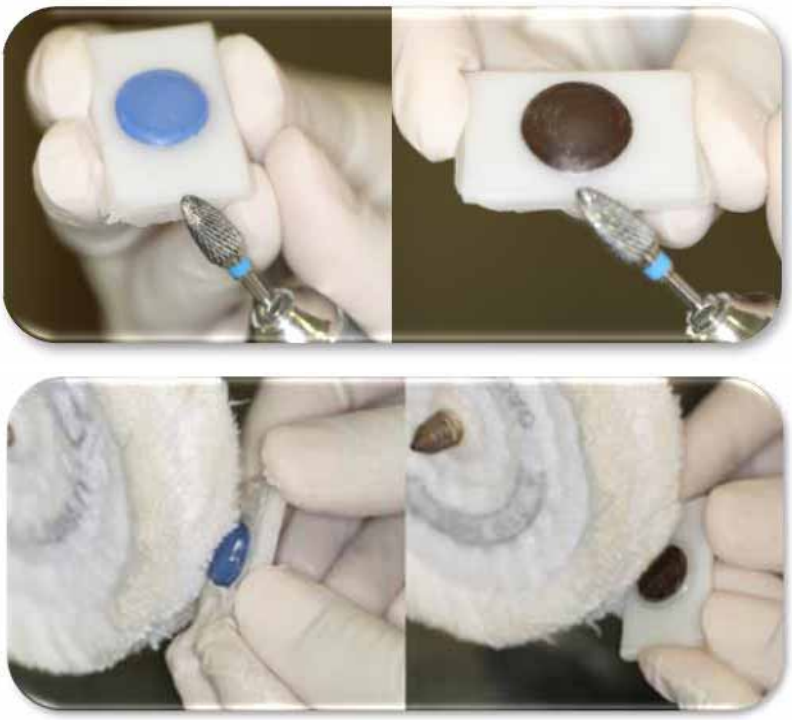


Figura 42. Acabamento e polimento das amostras.

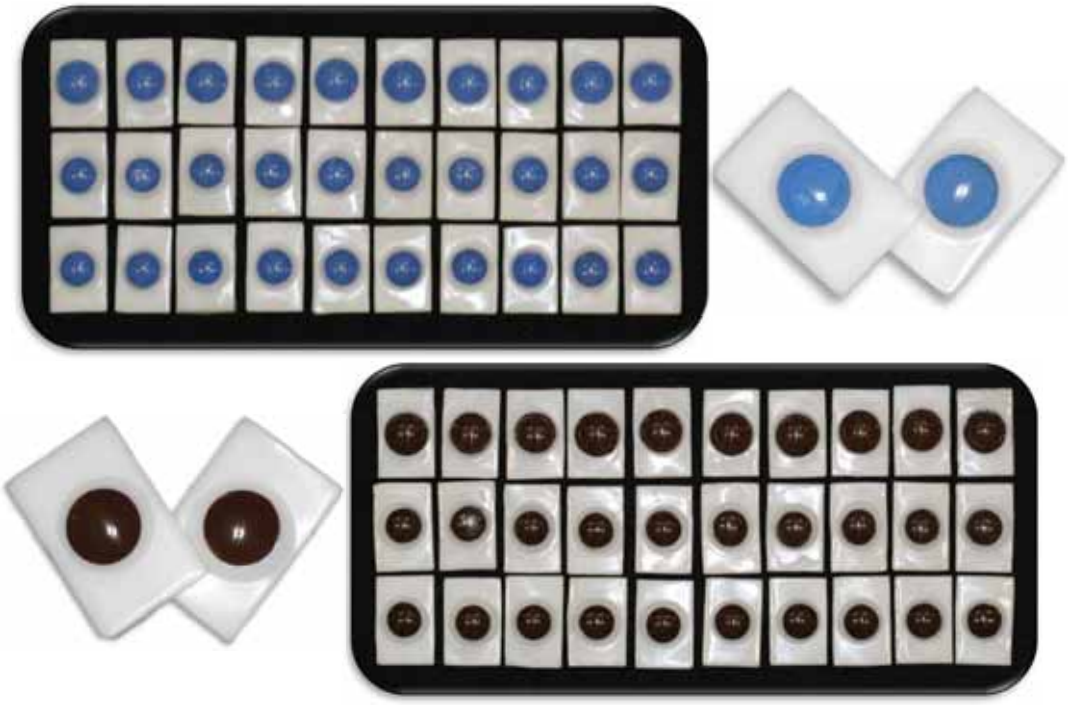


Figura 43. Amostras finalizadas com botão de íris na cor azul e marrom.

METODOLOGIA – ARMAZENAGEM E DESINFECÇÃO QUÍMICA – CAPÍTULO 3

Figura 44. Armazenagem das amostras imersas em soro fisiológico no interior de recipientes opacos em estufa bacteriológica a ±37°C.

Figura 45. Desinfecção das amostras com sabão neutro.

Figura 46. Desinfecção das amostras com Opti-Free e clorexidina.

ANEXO C – Tabela dos valores obtidos da contagem de células do teste de microbiologia.

Tabela 3. Contagem de células/mL para *Staphylococcus* spp. após os tratamentos desinfetantes em cada período de desenvolvimento do biofilme (Média e Desvio Padrão; n = 6).

Bactéria	Tratamento Desinfetante	Período de desenvolvimento do biofilme		
		24h	48h	72h
S. epidermidis	CTL 30	2.02E+08 (6.37E+07)	2.36E+09 (5.06E+08)	1.82E+10 (7.55E+09)
	NES 30	1.35E+08 (5.93E+07)	1.27E+09 (3.55E+08)	1.52E+10 (3.52E+09)
	OPF 30	2.12E+08 (4.04E+07)	1.43E+09 (7.39E+08)	2.10E+10 (7.05E+09)
	CTL 6	1.76E+08 (8.22E+07)	2.24E+09 (7.18E+08)	1.81E+10 (7.29E+09)
	OPF 6	7.79E+07 (2.00E+07)	6.46E+08 (2.01E+08)	7.57E+09 (3.15E+09)
	CTL 15	1.96E+08 (6.25E+07)	2.15E+09 (8.61E+08)	1.68E+10 (4.83E+09)
	EFF 15	2.11E+02 (6.89E+01)	3.00E+02 (2.29E+02)	1.07E+07 (6.63E+06)
	CTL 10	1.85E+08 (7.63E+07)	2.60E+09 (4.98E+08)	1.80E+10 (7.52E+09)
	CHX 0.5% 10	7.18E+01 (3.90E+01)	1.02E+06 (5.80E+05)	1.31E+08 (6.62E+07)
	CHX 2% 10	4.98E+01 (5.47E+01)	7.22E+01 (7.73E+01)	3.71E+04 (2.57E+04)
	CHX 4%10	1.65E+01 (2.76E+01)	2.75E+01 (2.48E+01)	2.20E+01 (2.69E+01)
S. aureus	CTL 30	1.77E+07 (6.41E+06)	1.91E+08 (8.36E+07)	1.42E+09 (4.23E+08)
	NES 30	6.58E+06 (2.84E+06)	1.22E+08 (5.91E+07)	1.32E+09 (4.04E+08)
	OPF 30	1.56E+07 (6.05E+06)	1.76E+08 (5.33E+07)	1.29E+09 (5.47E+08)
	CTL 6	1.28E+07 (7.57E+06)	2.01E+08 (4.39E+07)	1.87E+09 (7.22E+08)
	OPF 6	3.29E+05 (1.09E+05)	1.64E+07 (7.32E+06)	2.01E+08 (8.25E+07)
	CTL 15	1.54E+07 (6.88E+06)	1.81E+08 (6.33E+07)	1.70E+09 (5.88E+08)
	EFF 15	1.50E+02 (7.53E+01)	8.32E+01 (7.53E+01)	1.83E+02 (1.13E+02)
	CTL 10	1.69E+07 (7.33E+06)	2.06E+08 (8.83E+07)	1.38E+09 (5.42E+08)
	CHX 0.5% 10	1.61E+02 (1.06E+02)	4.89E+04 (3.38E+04)	1.11E+07 (8.89E+06)
	CHX 2% 10	2.28E+02 (5.74E+01)	2.50E+02 (1.21E+02)	5.23E+04 (3.27E+04)
	CHX 4% 10	7.75E+01 (2.74E+01)	1.67E+02 (1.86E+02)	1.50E+02 (1.13E+02)