

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rubens Signoretti Oliveira Silva

EFEITO DE SOLUÇÕES DE PRÓPOLIS VERDE GLICÓLICO NA REMOÇÃO DE
BIOFILME BACTERIANO EM SUPERFÍCIE DE ELASTÔMEROS UTILIZADOS NA
CONFECÇÃO DE PRÓTESES FACIAIS

BELO HORIZONTE

2020

Rubens Signoretti Oliveira Silva

EFEITO DE SOLUÇÕES DE PRÓPOLIS VERDE GLICÓLICO NA REMOÇÃO DE
BIOFILME BACTERIANO EM SUPERFÍCIE DE ELASTÔMEROS UTILIZADOS NA
CONFECCÃO DE PRÓTESES FACIAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito para conclusão do curso de
graduação em Odontologia da UFMG.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Amália Moreno

Belo Horizonte – MG

2020

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa uma etapa muito importante em minha vida, em que nessa caminhada de conquistas pessoais foram necessárias o apoio e ajuda de pessoas muito importantes para mim. Sendo assim, quero agradecer primeiramente a Deus, por toda força e sabedoria para conseguir chegar até aqui. Aos meus pais Paulo e Stefânia, aos meus irmãos Bruno e Leandro por toda força e apoio em todos momentos. Também, principalmente à minha orientadora Amália Moreno, em que me escolheu e me aceitou como orientando, disponibilizando este e outros trabalhos que foram um grande diferencial em minha graduação e por todo conhecimento compartilhado. Juntamente, agradeço a oportunidade de ter recebido o fomento disponibilizado pelo programa PIBIC. Ademais, é de suma importância enfatizar o trabalho realizado pela técnica do laboratório Fernanda Rocha, uma vez que realizamos este projeto em conjunto, também ao professor Vagner Santos por disponibilizar o laboratório, os agradeço por todo empenho e ensinamento compartilhados. Por fim, agradeço meus colegas de graduação, aos quais admiro muito, que se tornaram verdadeiros amigos, em que compartilhamos verdadeiros momentos de felicidade e conseguimos superar muitas dificuldades juntos. Para todos meu mais sincero obrigado!

RESUMO

A prótese maxilofacial está entre as várias modalidades da prótese bucomaxilofacial, sendo responsável por reconstruir artificialmente as perdas de substância da região de cabeça e pescoço. No entanto, estes materiais podem tornar-se meio de cultura propício para o desenvolvimento de dermatites recorrentes. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano de dois elastômeros maxilofaciais submetidos ao tratamento desinfetante com extrato glicólico de própolis verde brasileiro. Para a realização do estudo foram confeccionados corpos de prova de dois tipos de elastômeros maxilofaciais (RTV-Room Temperature Vulcanization e HCR- High Consistency Silicone Elastomer) no tamanho de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura; e esterilizados. Para a avaliação microbiológica as amostras de *S. aureus* foram utilizadas e submetidas a 24 horas de crescimento e desenvolvimento do biofilme sobre a superfície dos espécimes. Estes foram tratados com as soluções propostas no estudo durante 15 min: salina a 0,9% como controle positivo; gluconato de clorexidina a 2% como controle negativo; e glicólica de própolis verde, nas concentrações de 11%, 16% e 20%; Daro Brand antibacteriano sabonete gel e Daro Brand antimicrobiana líquido. Ao todo, foram utilizados 42 espécimes dos dois elastômeros maxilofaciais (n=3) e eles foram aleatoriamente distribuídos aos tratamentos. Em seguida foram vortexados para desagregar o biofilme implantado, e a avaliação quantitativa do biofilme foi realizada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os dados obtidos no estudo foram submetidos à análise estatística de Análise de Variância (ANOVA) dois-fatores. Verificou-se pelos resultados que os espécimes de ambos os elastômeros de silicone facial tratados com as soluções de extrato glicólico de própolis verde nas concentrações de 11%, 16% e 20%; e clorexidina a 2% não apresentaram UFC/mL na cepa de *S. aureus*, identificando o amplo espectro antibiofilme destes tratamentos. O antimicrobiano DaroBrand de ambos os elastômeros faciais apresentou menor UFC/mL comparado a solução salina e o DaroBrand sabonete, com diferença estatística significativa. Conclui-se que as soluções de extrato glicólico de própolis verde são alternativas eficazes na desinfecção de próteses maxilofaciais confeccionadas para ambos os elastômeros propostos.

Palavras-chaves: Própole. Biofilme. Elastômero maxilofacial. Prótese maxilofacial.

ABSTRACT

The maxillofacial prosthesis is among the various modalities of the maxillofacial prosthesis, being responsible for artificially reconstructing the loss of substance in the head and neck region. However, these materials may become a culture medium conducive to the development of recurrent dermatitis. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of two maxillofacial elastomers submitted to disinfectant treatment with glycolic extract of Brazilian green propolis. For the study, specimens of two types of maxillofacial elastomers (RTV-Room Temperature Vulcanization and HCR-High Consistency Silicone Elastomer) were made in the size of 10 mm in diameter and 2 mm in thickness; and sterilized. For microbiological evaluation, *S. aureus* samples were used and subjected to 24 hours of biofilm growth and development on the disc surface. They were treated with the proposed solutions in the study for 15 min: 0.9% saline as positive control; 2% chlorhexidine gluconate as negative control; and green propolis glycol, at concentrations of 11%, 16% and 20%; Daro Brand antibacterial soap and Daro Brand antimicrobial liquid. In total, 42 specimens of the two maxillofacial elastomers (n = 3) were used and they were randomly assigned to treatments. Then they were vortexed to disaggregate the implanted biofilm and the quantitative biofilm evaluation was performed by counting the number of colony forming units (CFU/mL). The data obtained in the study were submitted to statistical analysis: Two-way Analysis of Variance (ANOVA). The results showed that the specimens of both facial silicone elastomers treated with green propolis glycolic extract solutions at concentrations of 11%, 16% and 20%; and 2% chlorhexidine did not present CFU/mL in *S. aureus* strain, identifying the broad antibiofilm spectrum of these treatments. The DaroBrand antimicrobial of both facial elastomers had lower CFU/mL compared to saline and DaroBrand soap, with a statistically significant difference. It can be concluded that green propolis glycolic extract solutions are effective alternatives for the disinfection of maxillofacial prostheses made for both proposed elastomers.

Palavras-chaves: Propolis. Biofilm. Maxillofacial elastomer. Maxillofacial Prosthesis.

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)
Ind. Com. Ltda.	= Indústria e Comércio Limitada
mL	= mililitro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}L)
min	= minuto
h	= hora
%	= porcentagem
kgF	= quilograma força
°C	= Graus Celsius
SP	= São Paulo
RJ	= Rio de Janeiro
EUA	= Estados Unidos da América
TCC	= Trabalho de conclusão de curso
UFC/mL	= unidades formadoras de colônia por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras em papel com halo de inibição de <i>S. Aureus</i> para as soluções de propostos: (1) salina 0,9%; (2) gluconato de clorexidina 0,12% (3) gluconato de clorexidina 2%. (4-6) extrato glicólico de própolis verde a 11%, 16% e 20%; (7) antimicrobiano DaroBrand Líquido; e (8) antimicrobiano DaroBrand sabonete gel. ...	20
Figura 2 - Placas Petri do biofilme residual dos espécimes de RTV após incubação a 37°C por 24 horas para contagem do número de colônias formadas por mililitro. ...	211
Figura 3 - Placas Petri do biofilme residual dos espécimes de HCR após incubação a 37°C por 24 horas para contagem do número de colônias formadas por mililitro. ...	222
Figura 4 - Valores médios e erro padrão do número de células aderidas de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) por mL para cada tipo de elastômero maxilofacial e tratamento desinfetante. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos desinfetantes (P = 0,020; ANOVA).....	233
Figura 5 - Dois tipos de elastômero de silicone facial: (A) RTV (Silicone Grau Médico MDX 4-4210, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA), e (B) HCR (Silicone Grau Médico Q7-4735, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA).....	344
Figura 6 - Amostra de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	344
Figura 7 - Reagentes de microbiologia: meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (EUA HiMédia, EUA).	355
Figura 8 - Tratamentos de desinfecção proposto no estudo:	355
Figura 9 - Painel Polimerizador (Metal Vander, Brasil)	366
Figura 10 - Estufa (FANEM LTDA, SP, São Paulo, Brasil).....	366
Figura 11 - Vortex Mixer (BioMixer, Ribeirão Preto, SP, Brasil).	377
Figura 12 - Dessecador (PYREX, São Paulo, SP, Brasil)	377
Figura 13 - Matriz metálica.	388
Figura 14 - Espécimes de silicone faciais já polimerizados e estéreis.	388
Figura 15 - Inócuo bacteriano de <i>S. aureus</i>	399
Figura 16 - Comparação do método visual de <i>Mc Farland</i>	399
Figura 17 - Retirada dos espécimes esterilizados dos pacotes com pinça esterilizada.	40
Figura 18 - Placa de 24 poços com espécimes de silicone imersos em caldo BHI com <i>S. aureus</i> , na concentração de 10^8 células/mL. FIGURA A RTV (Silicone Grau Médico MDX 4-4210, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA), e FIGURA B	

HCR (Silicone Grau Médico Q7-4735, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA).	4040
Figura 19 - Incubação a 35°C das placas de 24 poços por 24 horas	411
Figura 20 - Placa de 24 poços contendo os espécimes com o biofilme formado sobre a superfície destes, após 24 horas de incubação a 35°C.	411
Figura 21 - Desinfecção dos espécimes após desenvolvimento do biofilme.....	422
Figura 22 - Lavagem dos espécimes.	422
Figura 23 - Pellet bacteriano em tubo <i>Falcon</i> TM	433
Figura 24 - Processo de agitação pelo Vortex.....	433
Figura 25 - Procedimento de diluição seriada em salina: (A) transferência de 100 µL da solução agitada contendo os espécimes para os ependorfs. (B) Cada ependorf conteve 900 µL de salina + 100 µL da solução transferida	444
Figura 26 - Aplicação da técnica da microgota para a contagem de células por mililitro.	444

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 METODOLOGIA.....	13
3.1 Preparação dos espécimes de elastômeros maxilofaciais.....	13
3.1.1 Elastômeros maxilofaciais	13
3.1.2 Confeção dos espécimes de elastômeros maxilofaciais	13
3.1.3 Avaliação da dureza Shore A	14
3.1.4 Esterilização dos espécimes de elastômeros maxilofaciais.....	15
3.2 Avaliação microbiológica.....	15
3.2.1 Preparação dos microrganismos	15
3.2.2 Implantação do biofilme	16
3.2.3 Tratamentos de desinfecção.....	16
3.2.4 Contagem das células do biofilme	17
3.3. Análise estatística	17
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	29
APÊNDICES.....	34
APÊNDICE A - Materiais e equipamentos utilizados no estudo.....	34
APÊNDICE B: Confeção dos espécimes de silicone facial.	38
APÊNDICE C: Cultura, desenvolvimento do biofilme e contagem das unidades formadoras de colônias.....	39

1 INTRODUÇÃO

A odontologia possui papel crucial na reabilitação maxilofacial em pacientes portadores de malformações congênitas e mutilações traumáticas ou patológicas. A confecção de próteses intra e extra-orais (maxilofaciais) com biomateriais permite a reabilitação do paciente, devolvendo a anatomia, função e estética, além de auxiliar na terapia psicológica. A prótese facial está entre as várias modalidades da prótese bucomaxilofacial, sendo responsável por reconstruir artificialmente ou aloplasticamente as perdas de substância da região de cabeça e pescoço. (GOIATO et al., 2012; BECKER et al., 2016; ALFENAS et al., 2017). Essa área da odontologia restaura a anatomia facial perdida ou comprometida por neoplasias malignas, traumas ou defeitos congênitos, por meio de substitutos artificiais, devolvendo a estética, além de contribuir para elevar a autoestima dos pacientes mutilados, reintegrando-os, assim, ao convívio social (BECKER et al., 2016).

Algumas neoplasias, como por exemplo, o carcinoma adenoide cístico (CAC), que é um tumor maligno de glândulas salivares de crescimento lento, porém tem uma invasão tumoral agressiva e de prognóstico desfavorável (AMORIM et al., 2003.; KOKEMUELLER et al., 2004; NEVILLE et al., 2009; PALMEIRO et al., 2005.). Além desta, a endoftalmite é uma das complicações mais graves ocorridas ao globo ocular. Entre todas as etiologias é mais comum o desenvolvimento dessa lesão após trauma (4,2%) (DUCH-SAMPER et al., 1997), o que pode ser devido a falta de assepsia da situação (SCHIRMBECK et al., 2000). Sendo assim, as cirurgias ressectivas podem ser eleitas para este tipo de neoplasia (MARAMBAIA et al., 2008) e lesão, o que tornariam possíveis pacientes para este tipo de prótese facial.

Atualmente, o elastômero maxilofacial é considerado o material que mais se aproxima do ideal para próteses faciais, por apresentar facilidade de manipulação, boas propriedades físicas e mecânicas, biocompatibilidade, custo relativamente baixo, permitir pigmentação e caracterização, e ter textura semelhante à da epiderme, possibilitando que seja alcançado padrão estético agradável, a ponto de a prótese ser mimetizada aos tecidos circunjacentes, atingindo aparência natural (HATAMLEH et al., 2016). No entanto, esses materiais de confecção das próteses, que são os elastômeros maxilofaciais, podem também apresentar alguns problemas associados com a sua utilização, tais como a absorção de água, deformação permanente, deterioração superficial e alteração de cor a longo prazo (HADDAD et

al., 2011; DOS SANTOS et al., 2012; GUIOTTI et al., 2016; NOBREGA et al., 2016). Adicionalmente, a colonização de próteses faciais por microrganismos tem sido relatada na literatura (ARIANI et al., 2012 e 2015).

É conhecido que as próteses maxilofaciais, tanto epíteses, quanto anaplerose (contidas em uma cavidade), quando instaladas, e em contato com as margens do tecido remanescente ao defeito facial ou loja cirúrgica, em sua grande maioria, estão contaminadas com os fluidos humanos, como sangue, suor e lágrima do paciente. (HENRIQUES et al., 2005; PARANHOS et al., 2007; GOIATO et al., 2010; ARIANI et al., 2012). Com isso, a superfície da prótese maxilofacial pode se tornar um reservatório para a colonização de uma determinada microbiota (PARANHOS et al., 2007; ARCIOLA et al., 2012; ARIANI et al., 2015). A maioria dos microrganismos infecciosos e colonizadores de superfícies de biomateriais são encontrados como comunidades microbianas complexas, encapsulados dentro de uma matriz extracelular, que permanece ligada à superfície de biofilme formada (HENRIQUES et al. 2005; ARCIOLA et al., 2012; XU et al., 2014). Esses microrganismos estão diretamente relacionados a casos de dermatite bacteriana, endoftalmite, entre outros, e também têm a capacidade de aderir em uma grande variedade de superfícies (PINHEIRO et al., 2018; HENRIQUES et al., 2007).

Entre os microrganismos colonizadores de próteses maxilofaciais e tecido remanescente encontram-se os estafilococos coagulase-positivos, cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus*. (ARIANI et al., 2012; GUIOTTI et al.; 2016). O *S. aureus* vive, principalmente, nas superfícies das mucosas e tem sido considerado um dos mais versáteis e perigosos patógenos humanos (PINHEIRO et al., 2018; GAÁL et al., 2005; ALTIERI et al., 2013).

Associado a higienização das próteses maxilofaciais por método de fricção cuidadosa de sua superfície interna, a técnica de desinfecção por imersão é essencialmente o método de escolha para estes materiais (PARANHOS et al., 2007; GOIATO et al., 2010; GUIOTTI et al.; 2016). Assim, a desinfecção dos materiais de uso protético maxilofacial pode ser realizada por meio de técnicas de limpeza e desinfecção química periódica. O uso da solução de gluconato de clorexidina, por exemplo, tem sido utilizada como agente antimicrobiano, impedindo a proliferação de microrganismos (GOIATO et al., 2010; GUIOTTI et al.; 2016). No entanto, possíveis danos estruturais aos biomateriais têm sido relatados com o seu uso (HADDAD et al., 2011; GUIOTTI et al.; 2016).

Alguns estudos recentes sobre o uso de fitoterápicos como agente antimicrobiano para biomateriais têm sido desenvolvidos, e apresentado resultados promissores (SANTOS et al., 2008; CAPISTRANO et al., 2013; GUIOTTI et al.; 2016). Estudo realizado por Farnesi et al. (2009) encontrou atividade antibacteriana do extrato de própolis verde contra *S. aureus*. O extrato de própolis apresenta, dentre outras vantagens, além da eficácia antimicrobiana, a baixa toxicidade, já que não há relatos de casos de efeitos colaterais, e poucos casos de alergia (ONLEN et al., 2007). Ainda, deve-se lembrar da ação já limitada dos demais produtos, devido ao aumento da resistência microbiana. Existem diferentes variedades de própolis, de acordo com a espécie vegetal visitada pelas abelhas, e as variações climáticas da região, na qual é produzida.

A própolis é um material resinoso coletado por abelhas a partir de plantas, e esta composição química depende de sua área de origem. Esta substância é utilizada como medicina complementar, tendo efeito anti-inflamatório na medicina popular (SANTOS et al., 2008). É encontrado uma variedade de componentes como flavonóides e fenólicos ácidos, mostrando efeitos como inibição da *Candida*. Também, vários novos compostos já foram identificados em amostras brasileiras de própolis verde, e estudos atestam seus efeitos biológicos como microbicida, antiinflamatório, atividades antioxidante, anticancerígena e citotóxica e seus usos terapêuticos (SFORCIN, 2016; BARLAK et al., 2011 ; BANKOVA, 2005).

Embora existam atualmente no mercado alguns produtos já bem estabelecidos de desinfecção para próteses intra-orais e lentes de contato oculares, ainda não se tem o mesmo para as próteses faciais. A grande maioria dos estudos são direcionados à redução da microbiota aderida aos materiais utilizados em próteses dentárias. Adicionalmente, deve-se considerar a especificidade da microbiota patogênica em pacientes portadores de defeitos faciais, bem como a diversidade entre os materiais utilizados na confecção destas reabilitações protéticas.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia de soluções à base de extrato glicólico de própolis verde brasileiro, comparativamente às soluções convencionais na remoção do biofilme da espécie de *Staphylococcus aureus*, desenvolvido em superfície de elastômeros maxilofaciais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar em estudo piloto se houve inibição do crescimento microbiano de uma cepa de *S. aureus* em amostras de papel tratados com solução de extrato glicólico de própolis verde, antimicrobiano e antibacteriano DaroBrand, soluções controle negativo de clorexidina, e positivo de salina e meio puro.

- Avaliar *in vitro* quantitativamente a eficácia do tratamento com solução de extrato glicólico de própolis verde, variando a concentração, na remoção do biofilme de uma cepa de *S. aureus*, sobre a superfície de dois elastômeros maxilofaciais.

- Verificar se houve eficácia do tratamento específico com antimicrobiano e antibacteriano DaroBrand, na remoção do biofilme de *S. aureus*, comparativamente ao controle.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação dos espécimes de elastômeros maxilofaciais

3.1.1 Elastômeros maxilofaciais

Neste estudo, foram utilizados dois tipos de elastômeros maxilofaciais: (1) RTV (Silicone Grau Médico MDX 4-4210, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA), e (2) HCR (Silicone Grau Médico Q7-4735, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA). Assim, foram confeccionados espécimes de silicone (10 mm de diâmetro, 2 mm de espessura), que serviram como substratos para o desenvolvimento do biofilme bacteriano, frente aos tratamentos com as soluções antimicrobianas propostas.

3.1.2 Confeção dos espécimes de elastômeros maxilofaciais

Para a confecção dos espécimes os procedimentos foram realizados portando-se luvas de procedimento (nitrílica sem pó; Descarpack), a fim de evitar possíveis contaminações do material. Para a padronização dos espécimes de elastômeros maxilofaciais, foi utilizada uma matriz metálica vazada na espessura de 2 mm e 10 mm de diâmetro, contendo ao todo 10 compartimentos circulares. Para isso, a superfície interna da base de uma mufla odontológica (VIPI STG; VIPI Ind. Com. Ltda., Pirassununga, SP, Brasil) foi isolada com produto à base de alginato (Cel-Lack) e preenchida com gesso pedra (Tipo III; Durone; Dentsply Ind e Com Ltda.), 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, sendo que uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) deve permanecer incluída no gesso com a superfície superior dela paralela as bordas da mufla. Após a cristalização do gesso, a matriz já descrita foi posicionada sobre a lâmina de vidro incluída no gesso e uma outra lamina de vidro com as mesmas dimensões da anterior foi posicionada sobre a matriz e fixada em suas extremidades com elastômero de silicone polimerizado por adição (Express XT; 3M ESPE). Após isso a superfície do gesso da base da mufla foi isolada e na sequência a contra-mufla foi posicionada e sobre a superfície desta última lamina de vidro foi vertido gesso pedra. Em seguida a mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH; Midas Dental

Produtos Ltda.) sobre pressão constante de 1,2Kg/F por 2 minutos. Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a superfície de ambos os vidros foram limpas com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.)

Em seguida, as proporções de base/catalisador dos elastômeros maxilofaciais foram previamente pesadas em balança digital de precisão (500g, Diamond), de acordo com as instruções do fabricante. Para o elastômero maxilofacial RTV as proporções foram misturadas com uma espátula de aço inoxidável (n. 36, Duflex) sobre papel A4 fixado em bancada, em temperatura ambiente de 23 ($\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 50 ($\pm 10\%$). Para o elastômero maxilofacial HCR a mistura foi realizada com o auxílio de um equipamento específico (Two Roll Mill, Brasil) a partir de 10 homogeneizações. Na sequência uma película de poliuretano foi devidamente posicionada (Polyurethane Sheet AI-513; Factor II Inc.) sobre as placas de vidro, a qual serviu como isolante para a separação final dos espécimes das placas. Após a obtenção de uma mistura homogênea do elastômero, esta foi inserida no interior das superfícies internas da matriz posicionada entre as placas de vidro na 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.

Para a polimerização do RTV e a remoção das bolhas de ar formadas durante o procedimento de manipulação, a mufla foi levada sob pressão de 40 psi ou lb/in², à temperatura de aprox. 115 ($\pm 3^\circ\text{C}$), durante 15 minutos (Polimerizadora elétrica; Metal Vander). Após esse período a pressão foi removida, e a matriz com os espécimes confinados em seu interior foi mantida por mais 15 minutos na polimerizadora, de forma a obter a cura acelerada do material. Após isso, os espécimes de elastômeros maxilofaciais permaneceram em repouso, à temperatura ambiente, durante 3 horas, para estabilização e completa polimerização. Para a polimerização do HCR a mufla foi levada na prensa de mão a uma estufa à temperatura de aprox. 150 ($\pm 3^\circ\text{C}$), durante 60 min. Após isso, os espécimes permaneceram em repouso, à temperatura ambiente de 23 ($\pm 2^\circ\text{C}$), durante 3 horas, para estabilização e completa polimerização do material.

3.1.3 Avaliação da dureza Shore A

A leitura da dureza dos espécimes foi realizada com auxílio do durômetro Shore A (Mitutoyo Digital HH-336, Hardmatic Durometer, SP, São Paulo, Brasil), a

fim de verificar adequação de valores desta propriedade mecânica do material após a polimerização, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. Para cada espécime foram realizadas três leituras em ambas as suas superfícies, e ao final obtida a média desses valores. Os espécimes que apresentaram valores de dureza Shore A não adequada aos padrões do fabricante foram descartados. Os valores médios de dureza para os espécimes confeccionados com RTV foi de 30,90 Shore A e para os espécimes de HCR foi de 39,27 Shore A. Os valores recomendados pelos fabricantes foram de 30 Shore A para o silicone RTV e 45 Shore A para o silicone HCR, ambos valores considerados após o tempo de polimerização.

3.1.4 Esterilização dos espécimes de elastômeros maxilofaciais

Todos os espécimes de elastômeros maxilofaciais foram submetidos à limpeza em água filtrada e gaze estéril, após isso, foram deixados ao ar livre, em ambiente asséptico, para secagem completa. Em seguida, todos os espécimes foram esterilizados por óxido de etileno, pela empresa Acecil Central de Esterilização Ind. Com. Ltda. (Campinas, Brasil), para eliminação de possíveis microrganismos remanescentes.

3.2 Avaliação microbiológica

3.2.1 Preparação dos microrganismos

A cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi utilizada no estudo. Para o preparo do inóculo de *Staphylococcus aureus*, as células foram mantidas em -70°C em solução contendo 25% de glicerol e semeadas em tubos de vidro contendo meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion Broth) (HiMédia, EUA) e incubadas a 37°C (HENRIQUES et al., 2005). A cultura foi iniciada em 10 mL de caldo BHI e mantida em crescimento a 35°C por 24 horas. Após este período a amostra foi comparada com a escala nefelométrica de Mc Farland (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.) sendo o padrão de turvação mais frequente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivos líquidos.

Inicialmente para o estudo piloto foi semeado 400 µL do meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion Broth) (HiMedia, EUA) mais inóculo de *S. aureus*

em uma placa petri contendo o meio de cultura ágar BHI (Brain Heart Infusion ágar) (KASVI). Em seguida, foi distribuído aleatoriamente pela placa 8 amostras de papel esterilizados com 8 mm de diâmetro e ao todo foram utilizados 32 amostras de papel (n=4). Em seguida foi gotejado 20 µL de alguns tratamentos propostos para o estudo sobre a superfície das amostras de papel. As soluções propostas no estudo piloto foram: (1) salina 0,9%; (2) gluconato de clorexidina a 0,12% (solução bucal noplak max com flúor; Daudt) e (3) 2% (Maquira); (4-6) extrato glicólico de própolis verde a 11%, 16% e 20% (Bee Propolis Brasil); (7) antimicrobiano DaroBrand Líquido (Factor II Inc.); e (8) antibacteriano DaroBrand sabonete gel (Factor II Inc.). Após o gotejamento, as placas (n=4) foram encubadas e mantidas em crescimento a 35°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, quando observada a presença de halos ao redor da amostra (halo de inibição positivo) significou que a solução desinfetante foi capaz de inibir o crescimento da cepa, e ao contrário, quando não houveram halos de inibição (halo de inibição negativo), não houve crescimento da cepa. No caso de halos positivos, os diâmetros (em mm) destes foram mensurados e então calculadas as médias dos resultados.

3.2.2 Implantação do biofilme

Em câmara de fluxo, os espécimes de elastômero maxilofaciais foram retirados do envelope de esterilização com o auxílio de uma pinça estéril e, sob condições assépticas, transferidos individualmente na posição horizontal para uma placa de cultura de 24 poços contendo 0,9 mL do meio de cultura BHI (HIMEDIA, PA). Em seguida 100 µL de inóculo bacteriano, *S. aureus*, na concentração de 10⁸ células/mL foi adicionado no caldo BHI contido em cada de poço da placa. Os espécimes foram mantidos a 35°C durante 24 horas (fase de crescimento inicial) do biofilme em condições de microaerofilia (5% de CO₂).

3.2.3 Tratamentos de desinfecção

Após o período de incubação de 24 horas, os espécimes de elastômero maxilofaciais seguiram imediatamente ao tratamento com as soluções selecionadas para o estudo: (1) salina 0,9% como controle positivo (HADDAD *et al.*, 2011); (2) gluconato de clorexidina a 2% (Maquira) como controle negativo, (3-5) glicólica de extrato de própolis verde, a nas concentrações de 11%, 16% ou 20% (Bee Própolis Brasil); (6) antimicrobiana Daro Brand Líquido (B-200-09 Daro Brand; Factor II Inc.) e

(7) antibacteriano Daro Brand sabonete gel (B-200-12 Daro Brand; Factor II Inc.). Os 7 espécimes foram aleatoriamente distribuídos, sendo que, neste estudo foram utilizados 21 espécimes confeccionadas em elastômero maxilofacial líquido e 21 confeccionado em elastômero maxilofacial denso, totalizando 42 espécimes (n=3). Os tratamentos de desinfecção foram realizados em ambiente asséptico, de forma que os espécimes colonizados da placa de 24 poços foram retirados e lavados em 1 mL de solução salina 0,9% (NaCL) para remover as células fracamente aderidas, e imergidos, individualmente, em uma nova placa de cultura de 24 poços contendo 1 mL de cada solução desinfetante durante 15 min, e, posteriormente, lavados novamente (GUIOTTI et al., 2016). Para o tratamento com o antimicrobiano Daro Brand sabonete gel, os espécimes foram imergidos por 20 segundos, simulando uma lavagem usual.

3.2.4 Contagem das células do biofilme

Após a limpeza, os espécimes de elastômero maxilofacial foram imersos separadamente em 1 ml de salina 0,9% contido em tubos falcon. Para o desprendimento do biofilme aderido a eles, cada tubo falcon contendo-o foi individualmente agitado em vortex três vezes (7 W durante 60 s, com pausa de 5 min entre cada agitação em cubeta com gelo). Em seguida, as suspensões contendo o biofilme foram homogeneizadas e diluídas em série em 900 µL de solução salina, 0,9% para cada 100 µL de amostra.

Para a semeadura da diluição em série foi aplicada a técnica de microgota em placa petri contendo BHI ágar (Brain Heart Infusion Agar) (ROMEIRO, 2001). Assim, cada placa de Petri correspondeu a um grupo de tratamento, sendo dividida em cinco sessões identificadas por diluição: 10^{-1} a 10^{-6} . Para cada diluição foram aplicadas 3 gotas de 10 µL, retiradas das suspensões diluídas. As placas de petri foram incubadas a 35°C, ambiente de anaerobiose por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi obtido a partir da média entre a contagem das colônias das 3 gotas para cada diluição, multiplicado por um fator de correção (devido aos 10 µL de cada gota) e pelo inverso da diluição.

3.3. Análise estatística

Os dados foram analisados com o software SPSS (versão 23). A transformação Box-Cox foi utilizada para a obtenção de dados em acordo com a distribuição normal para o teste de Kolmogorov-Smirnov ($P=0,200$). A transformação indicou que a função logarítmica natural (\ln) aplicada aos dados atende aos pressupostos da Análise de Variância (ANOVA). A Análise de Variância (ANOVA) dois-fatores foi realizada para verificar a diferença significativa entre os fatores analisados: tipo de elastômero de silicone facial e tratamentos de desinfecção. As diferenças significativas nos valores obtidos na ANOVA dois-fatores foram comparados por teste de Tukey HSD em nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS

O estudo piloto realizado identificou que a solução de extrato de própolis a base de propilenoglicol, como agente antibacteriano em cepa de *S. aureus* foi eficaz na inibição de crescimento do biofilme em amostras de papel. Também se observou que as amostras embebidas com solução glicólica de própolis verde apresentaram halos de inibição positivo após 24 horas de crescimento do microrganismo. Estes resultados apresentaram-se promissores para a pesquisa com testes quantitativos de contagem microbiana. Em contrapartida, o agente DaroBrand Líquido foi menos eficaz, porque não apresentou halo ao redor da amostra (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Valores mensurados (em mm) a partir do diâmetro dos halos de *S. aureus* formados ao redor das amostras tratados com as soluções propostas: (1) salina 0,9%; (2) gluconato de clorexidina 0,12% (3) gluconato de clorexidina 2%. (4-6) extrato glicólico de própolis verde a 11%, 16% e 20%; (7) antimicrobiano DaroBrand Líquido; e (8) antimicrobiano DaroBrand sabonete gel.

Tratamentos propostos	Média do halo de <i>S. aureus</i>
1	0
2	10
3	7
4	18
5	19
6	17
7	8
8	0

Figura 1 - Amostras em papel com halo de inibição de *S. Aureus* para as soluções de propostos: (1) salina 0,9%; (2) gluconato de clorexidina 0,12% (3) gluconato de

clorexidina 2%. (4-6) extrato glicólico de própolis verde a 11%, 16% e 20%; (7) antimicrobiano DaroBrand líquido; e (8) antibacteriano DaroBrand sabonete gel.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Os espécimes para ambos os elastômeros maxilofaciais tratados com as soluções de extrato glicólico de própolis verde, para todas as concentrações (11%, 16% e 20%); e gluconato de clorexidina a 2%-controle negativo não apresentaram UFCs na cepa de *S. aureus*, identificando o amplo espectro antibiofilme destes tratamentos (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Placas Petri do biofilme residual dos espécimes de RTV após incubação a 37°C por 24 horas para contagem do número de colônias formadas por mililitro.

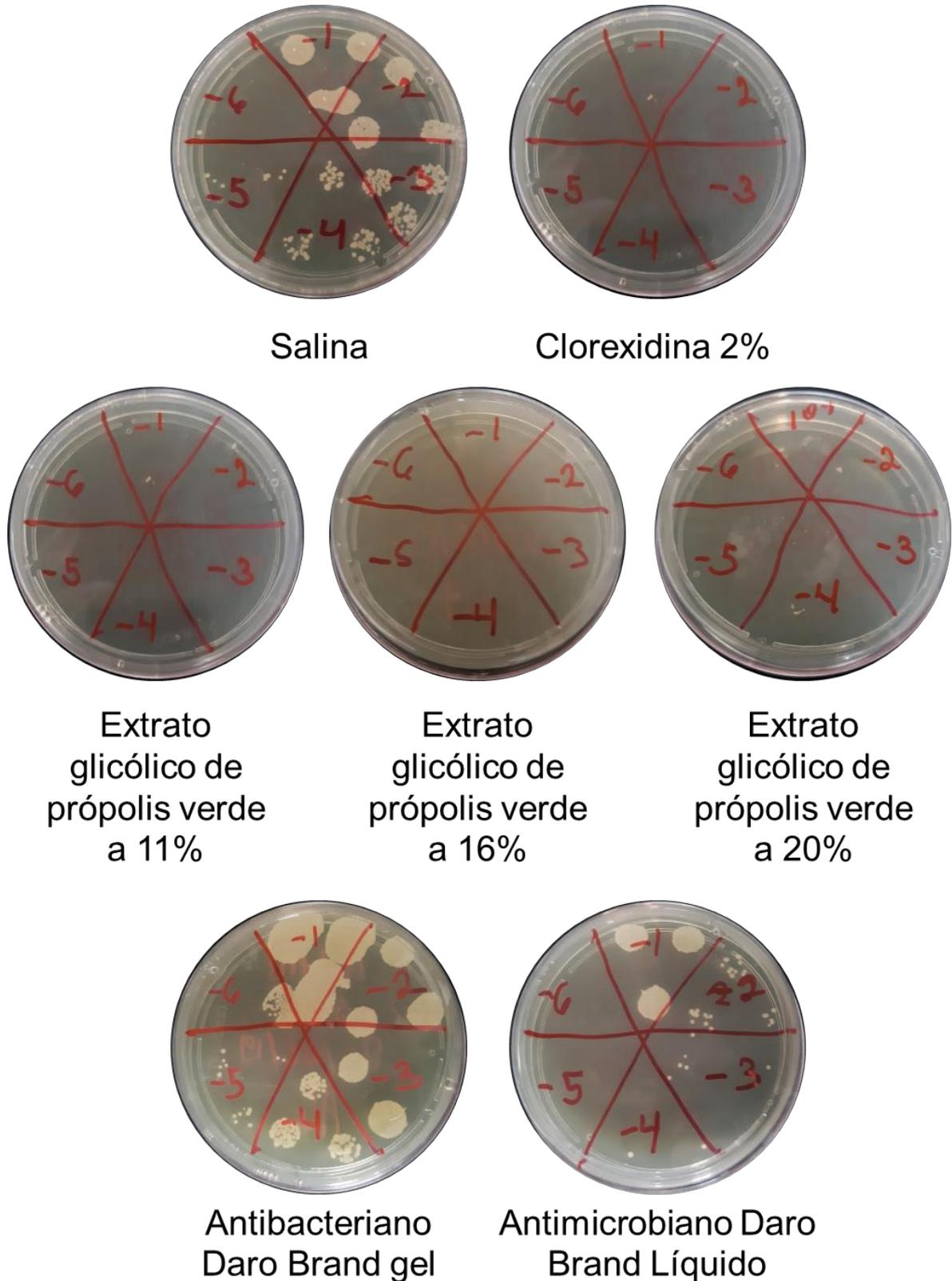
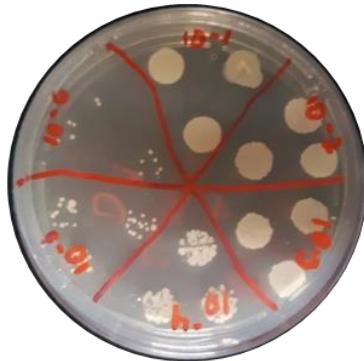
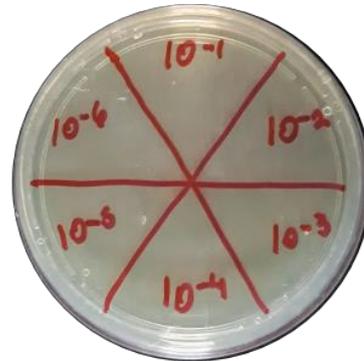


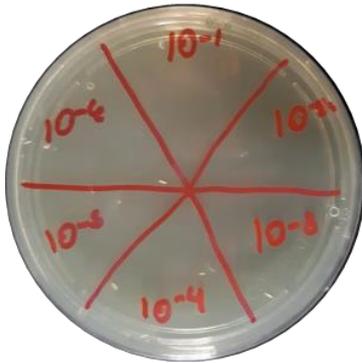
Figura 3 - Placas Petri do biofilme residual dos espécimes de HCR após incubação a 37°C por 24 horas para contagem do número de colônias formadas por mililitro.



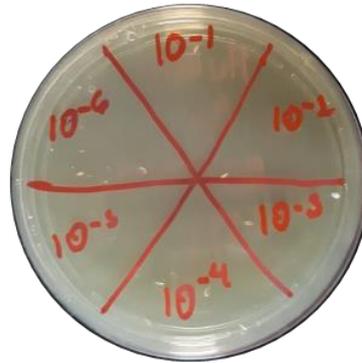
Salina



Clorexidina 2%



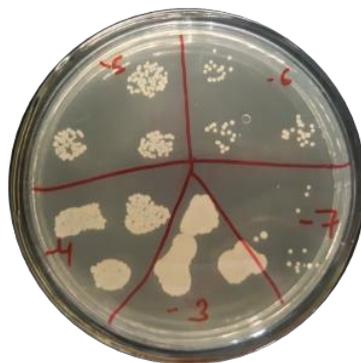
Extrato
glicólico de
própolis verde
a 11%



Extrato
glicólico de
própolis verde
a 16%



Extrato
glicólico de
própolis verde
a 20%

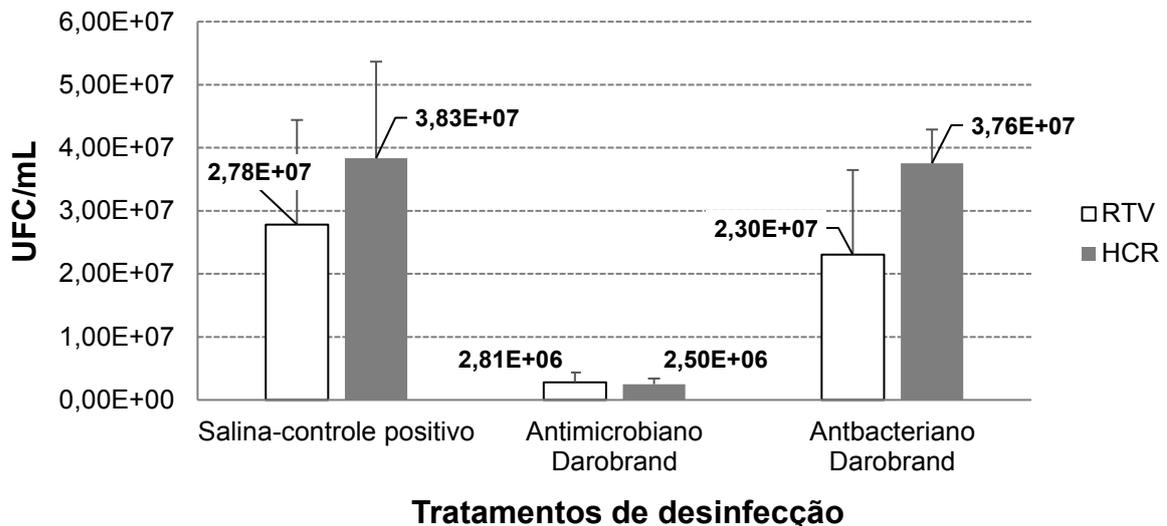


Antibacteriano
Daro Brand gel



Antimicrobiano Daro
Brand Líquido

Figura 4 - Valores médios e erro padrão do número de células aderidas de *S. aureus* (ATCC 25923) por mL para cada tipo de elastômero maxilofacial e tratamento desinfetante. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos desinfetantes ($P = 0,020$; ANOVA).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 2. Resultado do teste ANOVA para dois fatores para ln (número de células aderidas/mL).

Fatores de variação	gl	SQ	QM	F	<i>p</i>
Tipo de elastômero	1	1,286	1,286	0,434	0,523
Tratamento desinfetante	2	32,971	16,486	5,558	0,020*
Tipo × tratamento	2	2,713	1,356	0,457	0,644
Erro	12	35,592	2,966		
Total	17	72,563			

* $p < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

Os valores médios e os erros padrões de UFC para cada tipo de elastômero facial e tratamento desinfetante estão apresentados na figura 4. Pode-se verificar que não houve diferença estatística significativa entre os fatores tipo de elastômero maxilofacial e na interação entre tipo e tratamento ($P > 0,05$), no entanto o tratamento desinfetante foi estatisticamente significativo ($P = 0,02$ (Tabela 2)). Entre os tratamentos desinfetantes, observou-se menor número de UFC para os

espécimes tratados com antimicrobiano DaroBrand de ambos os elastômeros maxilofaciais, com diferença estatisticamente significativa (figura 4; tabela 2; $P=0,040$; Tukey test), em relação a solução salina-controle positivo e antibacteriano DaroBrand, independentemente do tipo de elastômero facial. Não houve diferença estatística significativa entre a solução antibacteriana DaroBrand e salina-controle positivo, independentemente do tipo de elastômero facial ($P > 0,05$; ANOVA e Tukey test) (Tabela 2 e Figura 4).

5. DISCUSSÃO

A solução de extrato glicólico de própolis verde mostrou-se eficaz agente antibacteriano para o biofilme formado por *S. aureus* na superfície dos espécimes de elastômeros maxilofaciais. No estudo piloto, todas as soluções apresentaram halo de inibição de crescimento bacteriano, o que demonstra algum efeito antimicrobiano. É conhecido que a própolis é uma substância natural coletada pela *Apis* abelhas *mellifera* em várias espécies de plantas para proteger contra a entrada de microrganismos, fungos e bactérias na colmeia (CASTALDO et al., 2002; BANKOVA et al., 2005). Também serve para as abelhas como material de vedação para impedir a entrada de luz e umidade no interior da colmeia. A própolis verde possui propriedades adesivas de óleos que interagem fortemente com as proteínas da pele sendo idealmente nocivo para desinfecção de próteses maxilofaciais (BURDOCK 1998; BOYANOVA et al., 2006).

Neste estudo também foi realizada uma simulação *in vitro* das condições encontradas na interface de contato prótese maxilofacial/região do defeito facial. Todas as concentrações do extrato glicólico de própolis verde apresentaram amplo espectro antibiofilme, pois não houve UFC/mL nos espécimes tratados com essas soluções. Os resultados de extrato glicólico de própolis verde foram iguais aos encontrados para o gluconato de clorexidina a 2%, solução já consolidada pela literatura como agente antimicrobiano (GUIOTTI et al., 2016).

A própolis já mostrou previamente atividade antimicrobiana eficiente contra *Pseudomonas sp* e *Staphylococcus aureus* (JÚNIOR et al., 2006). Esses microrganismos estão etiologicamente relacionados à infecções e doenças de pele em humanos e animais. Alguns estudos verificaram que o efeito antimicrobiano da própolis é diretamente proporcional à sua concentração (AWALE et al., 2005). No entanto, em nosso estudo não houve diferença entre as concentrações de extrato glicólico de própolis verde. Os extratos da própolis a base de propilenoglicol em nosso estudo exibiram antibacterianos significativos na *simulação in vitro*. Este fato pode ser devido à própolis apresentar componentes específicos, como os flavonóides, os ácidos aromáticos e os ésteres, bem como ação bactericida devido ao ácido cinâmico e coumarin (PEREIRA et al., 2011; MIGUEL et al. 2011).

A qualidade de ação já confirmada, associada à facilidade de preparo e de uso, ao custo acessível, e à ausência de reações adversas advindas da substância

própolis, configura o uso dos fitoterápicos como agentes relevantes na manutenção da saúde dos indivíduos reabilitados (SANTOS, 2012). Adicionalmente, a desinfecção com solução de extrato de própolis atribui grande vantagem, já que dispensa a limpeza mecânica, que é prejudicial para uma prótese facial (HENRIQUES et al., 2005). Devido à carência de estudos quanto a produtos para a higienização e desinfecção de prótese maxilofacial, as soluções de extrato glicólico de própolis verde podem ser alternativas eficazes para controle do biofilme bacteriano aderido ao biomaterial. O uso da própolis na odontologia vem sendo bastante embasado, tanto para tratamento de afecções orais, quanto à estomatite protética, como para o mesmo fim aqui proposto, ou seja, desinfecção de prótese intra ou extra-oral (NORONHA et al., 2014). Existem poucos estudos clínicos em humanos sobre a eficácia de extratos de plantas brasileiras no tratamento da candidíase oral. Mas recentemente, a eficácia humana do extrato de própolis verde brasileiro derivada de *B. dracunculifolia* no controle de doenças orais, e para a prevenção e controle da mucosite oral e candidíase em pacientes com neoplasias malignas e irradiado na região da cabeça e pescoço (PINA et al., 2017; NORONHA et al., 2017).

Cada extrato glicólico tem funções diferentes de acordo com a matéria prima, podendo ser emolientes, hidratantes, adstringentes, anti-inflamatórios, cicatrizantes, estimulantes, entre outras propriedades. O propilenoglicol é um solvente viscoso, utilizado em uma grande variedade de formulações farmacêuticas de uso tópico, devido a sua propriedade emoliente. O extrato de própolis obtido com glicóis apresentou resultados eficazes em relação a alteração de cor a longo prazo como agente desinfetante em silicone facial (MIRANDA et al., 2019). Além disso, essa formulação na preparação de extratos vegetais propicia formas farmacêuticas emulsionadas mais estáveis, por possibilitar informações que assegurem o sucesso da substituição, do álcool 93,7 (p/p) como líquido extrator no preparo de extratos de própolis (KUBILIENE et al., 2015). Neste estudo foi preconizado o uso de extrato de glicólico de própolis verde em relação ao etanólico por apresentar maior estabilidade de cor. (MIRANDA et al., 2019).

A solução antimicrobiana DaroBrand Líquido apresentou-se eficaz em relação ao controle, mas não foi encontrado estudos comparativos e também, o fabricante não disponibiliza a composição para investigação de seus efeitos. Diante disso o uso do extrato de própolis aplicado a prótese maxilofacial, pode suprir parte da grande

necessidade de melhores protocolos de higienização e desinfecção, facilitando de forma considerável a adaptação, e o uso prolongado dessas próteses. Nosso estudo apresenta que a própolis em solução a 10% foi a melhor opção dentre as alternativas testadas, pois se mostrou efetiva já em pouco tempo de contato com o espécime contaminado, o que permite que a permanência do indivíduo com a prótese ausente seja também curto, sem que comprometa a sua eficácia. No entanto, existe a necessidade de mais estudos sobre o assunto, bem como a realização de testes de citotoxicidade com o objetivo de avaliar a reação da mucosa ao uso da própolis.

Também, como uma limitação deste estudo, por já existir estudos quanto a colonização de outros microrganismos nas superfícies do silicone das próteses faciais (ARIANI et al, 2013), há uma necessidade da continuação deste estudo em relação a eficácia da desinfecção do extrato glicólico de própolis verde quanto ao biofilme de múltiplas espécies, como por exemplo os fungos *Cândida spp*, que também são colonizadores deste tipo de prótese (BATISTELLA et al., 2015).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentaram o efeito das soluções glicólicas de extrato de própolis verde com amplo espectro antibiofilme de *Staphylococcus aureus* na superfície de silicone maxilofacial protético, semelhante ao gluconato de clorexidina a 2%. Em relação ao tratamento com antimicrobiano (líquido) específico Daro Brand®, verificou-se menor número de UFC, quando comparado ao controle de água destilada.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, E.R. *et al.* Management of Peri-Implant Hypertrophic Scarring for an Ear Prosthesis. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 28, n. 8, p. e777-e778, 2017.
- ALTIERI, K.T. *et al.* Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 487-491, 2013.
- AMORIM, R.F.B.; SILVA, L.Y.C.; FREITAS, R.A. Aggresssive clinical course of adenoid cystic carcinoma. **Rev Bras PatolOral**, 2(2):17-20, 2003.
- ARCIOLA, C.R. *et al.* Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- ARIANI, N. *et al.* Current state of craniofacial prosthetic rehabilitation. **The International Journal Of Prosthodontics**. Groningen, p. 57-67, out. 2013.
- ARIANI, N. *et al.* Efficacy of cleansing agents in killing microorganisms in mixed species biofilms present on silicone facial prostheses-an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 9, p. 2285-2293, 2015.
- ARIANI, N. *et al.* Microbial biofilms on facial prostheses. **Biofouling**, v. 28, n. 6, p. 583-591, 2012.
- AWALE, S. *et al.* Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6, p. 858-864, 2005.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- BARLAK, Y. *et al.* Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. **Proteome Science**, v. 9, n. 1, p. 74, 2011.

BATISTELLA, E. *et al.* Silicone utilizados em próteses bucomaxilofaciais extraorais: uma revisão de literatura. 2015.

BECKER, C.; BECKER, A. M.; PFEIFFER, J. Health-related quality of life in patients with nasal prosthesis. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 1, p. 75-79, 2016.

BOYANOVA, L. *et al.* In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. **Anaerobe**, v. 12, n. 4, p. 173-177, 2006.

BURDOCK, GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CAPISTRANO, H.M. *et al.* Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of Candida-associated denture stomatitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

DOS SANTOS, D. M. *et al.* Effect of addition of pigments and opacifier on the hardness, absorption, solubility and surface degradation of facial silicone after artificial ageing. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 8, p. 1249-1253, 2012.

DUCH-SAMPER, A.M., MENEZO, J.L., HURTADO-SARRIÓ. Endophthalmitis following penetrating eyes injuries. **Acta Ophthalmol Scand**, 75:104-6, 1997.

FARNESI, A.P. *et al.* Effects of stinglessbee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

FERNANDES JÚNIOR, A. *et al.* Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural- Santa Maria**, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

GAÁL, V. *et al.* In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 45, n. 3-4, p. 125-130, 2005.

GOIATO, M. C. *et al.* Care and cleaning of maxillofacial prostheses. **Journal Craniofacial Surgery**, v. 21, n. 4, p. 1270-1273, 2010.

GOIATO, M. C. *et al.* Rehabilitation with ear prosthesis linked to osseointegrated implants. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. 150-154, 2012.

GUIOTTI, A. M. *et al.* Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 116, n. 1, p. 136-143, 2016.

HADDAD, M. F. *et al.* Color stability of maxillofacial silicone with nanoparticle pigment and opacifier submitted to disinfection and artificial aging. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 9, p. 095004, 2011.

HATAMLEH, M. M. *et al.* Mechanical Properties and Simulated Aging of Silicone Maxillofacial Elastomers: Advancements in the Past 45 Years. **Journal of Prosthodontics**; v. 25, n. 5, p. 418-426, 2016.

HENRIQUES, M. *et al.* Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to silicone-hydrogel contact lenses. **Optometry & Vision Science**, v. 82, n. 6, p. 446-450, 2005.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 391-396, 2007.

KOKEMUELLER, H.; *et al.* Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a 20 years experience. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 33:25-31, 2004.

KUBILIENE, L. *et al.* Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complement Altern Med**, v.15, p.156, 2015.

MARAMBAIA, O.; *et al.* Carcinoma adenóide cístico do seio esfenóide. **Arq Int Otorrinolaringol / Intl Arch Otorhinolaryngol**, 12(4):571-3, 2008.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D. Is propolis safe as an alternative medicine? **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, Mumbai, v. 3, n. 4, p. 479-495, 2011.

MIRANDA, N. B. *et al.* Optical parameters and hardness of two maxillofacial elastomers after immersion in different solutions of Brazilian green propolis extract. **J Prosthet Dent**, v. 122, n. 2, p. 168-175, 2019.

NEVILLE, B.W.; *et al.* Patologia Oral & Maxilofacial. **2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2009.

NOBREGA, A. S. *et al.* Influence of adding nanoparticles on the hardness, tear strength, and permanent deformation of facial silicone subjected to accelerated aging. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 116, n. 4, p. 623-629. e1, 2016.

NORONHA, V. R. A. S. *et al.* Propolis gel versus enzydamine in preventing oral mucositis for patients irradiated in head and neck: A preliminar study. **Oncology Journal | Cancer Reports and Reviews**, v. 1, n. 2, p. 24, 2017.

ONLEN, Y. *et al.* Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism with topical mupirocin. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 13, n. 7, p. 713-718, 2007.

PALMEIRO, M.R.; *et al.* Carcinoma adenóide cístico - relato de caso. **Rev Odonto Ciência**, 20(50):388-92, 2005.

PARANHOS, R. M. Z. F. *et al.* Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 1, p. 33-38, 2007.

PEREIRA, E. M. R. *et al.* Clinical Evidence of the Efficacy of a Mouthwash Containing Propolis for the Control of Plaque and Gingivitis: A Phase II Study. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, vol 2011, ID article 750249 (7 pages), Jan, 2011.

PINA, G. M. *et al.* Efficacy of propolis on the denture stomatitis treatment in older adults: A multicentric randomized trial. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2017:8971746, 2017.

PINHEIRO, J. B. *et al.* Genomic identification of microbial species adhering to maxillofacial prostheses and susceptibility to different hygiene protocols. **Biofouling**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2018.

RAS NORONHA, V. *et al.* Mucoadhesive propolis gel for prevention of radiation-induced oral mucositis. **Current Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 359-364, 2014.

ROMEIRO, R. S. Métodos em bacteriologia em plantas. Capítulo 12: Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão.; Editora UFV, 279 p, 2001.

SALATINO, A. *et al.* Origin and Chemical Variation of Brazilian Própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTOS, V. R. *et al.* Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, London, v. 22, n. 11, p. 1544-1547, 2008.

SCHIRMBECK, T. *et al.* Endoftalmite: uma análise de 58 casos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, p. 39-44, 2000.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

VEIGA, R. S. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

XU, Li-Chong; SIEDLECKI, C. A. Staphylococcus epidermidis adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. **Biomedical Materials**, v. 9, n. 3, p. 035003, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Materiais e equipamentos utilizados no estudo.

Figura 5 - Dois tipos de elastômero de silicone facial: (A) RTV (Silicone Grau Médico MDX 4-4210, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA), e (B) HCR (Silicone Grau Médico Q7-4735, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA).



(A)

(B)

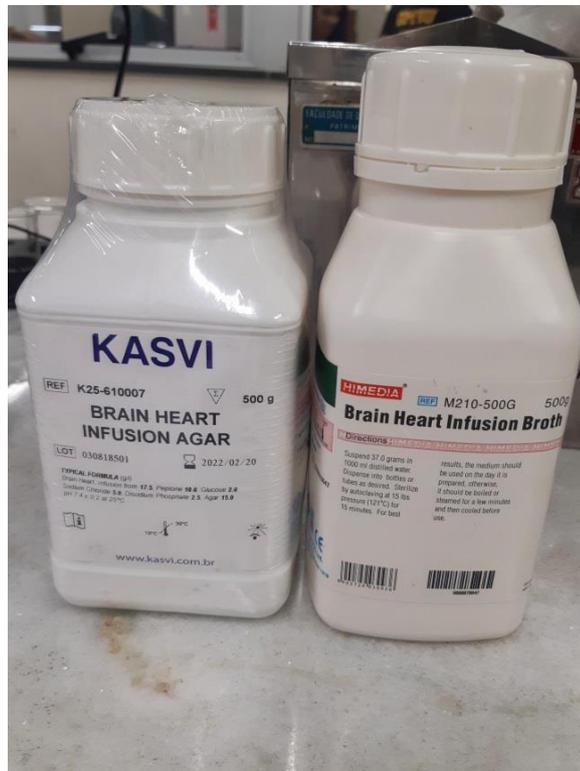
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 6 - Amostra de *S. aureus* (ATCC 25923)



FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 7 - Reagentes de microbiologia: meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (EUA HiMédia, EUA).



FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 8 - Tratamentos de desinfecção proposto no estudo:



FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 9 - Panela Polimerizadora (Metal Vander, Brasil)



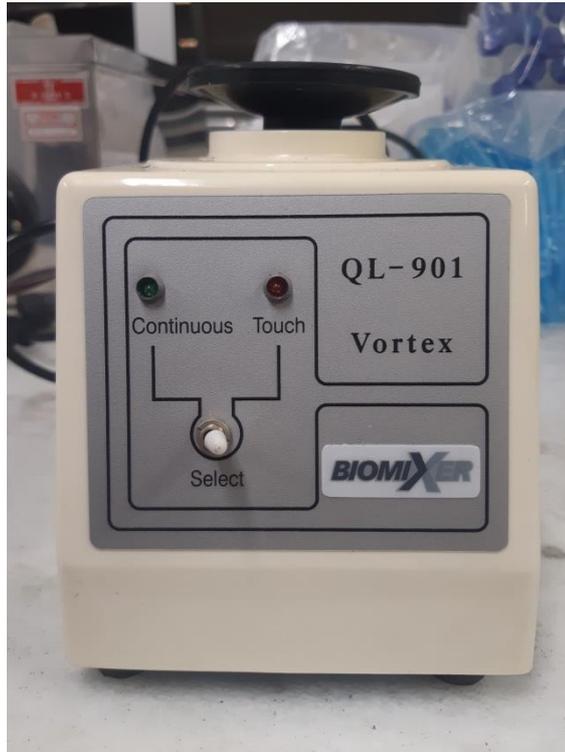
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 10 - Estufa (FANEM LTDA, SP, São Paulo, Brasil)



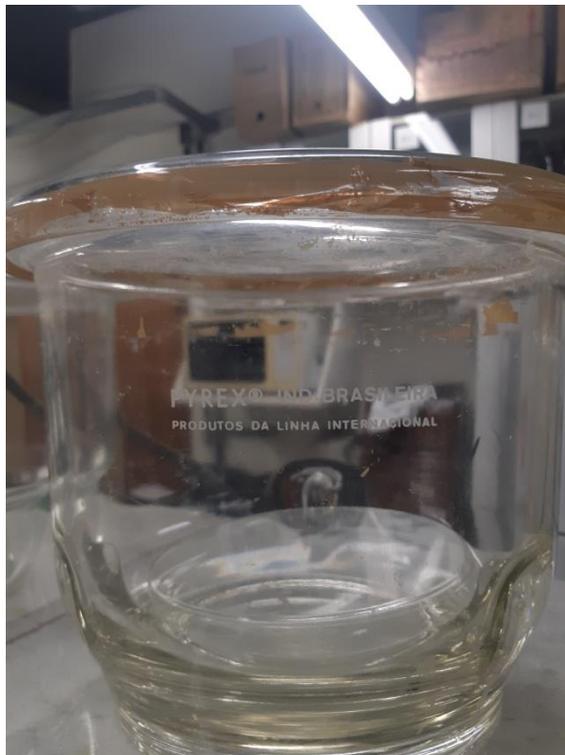
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 11 - Vortex Mixer (BioMixer, Ribeirão Preto, SP, Brasil).



FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 12 - Dessecador (PYREX, São Paulo, SP, Brasil)



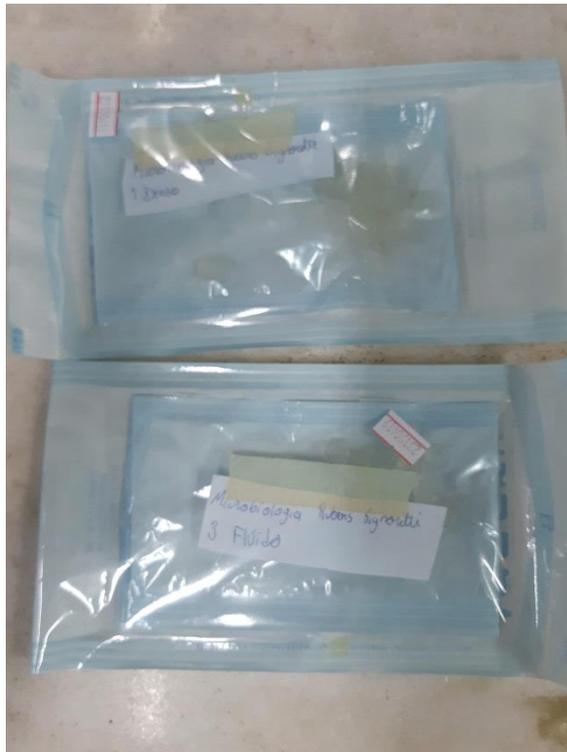
FONTE: Arquivo pessoal.

APÊNDICE B: Confeção dos espécimes de silicone facial.
Figura 13 - Matriz metálica.



FONTE: Arquivo pessoal.

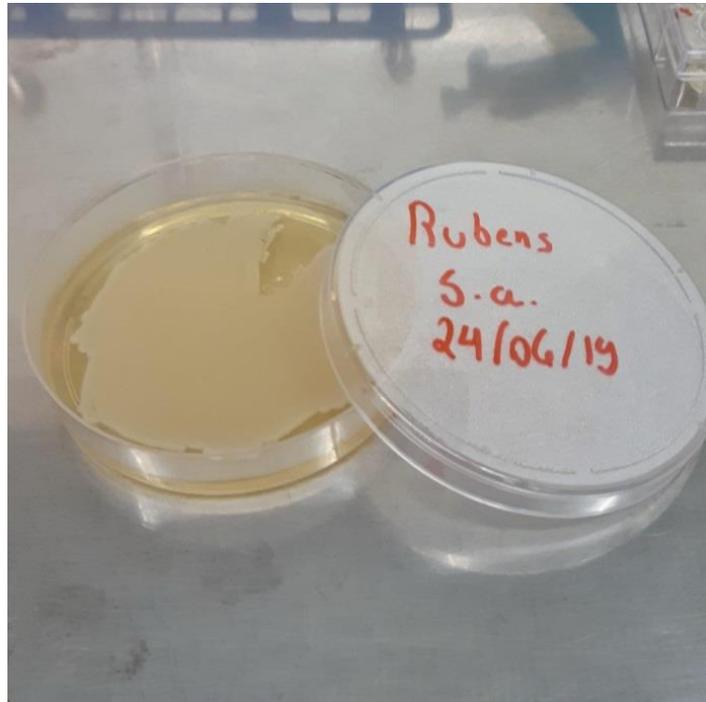
Figura 14 - Espécimes de silicone faciais já polimerizados e estéreis.



FONTE: Arquivo pessoal.

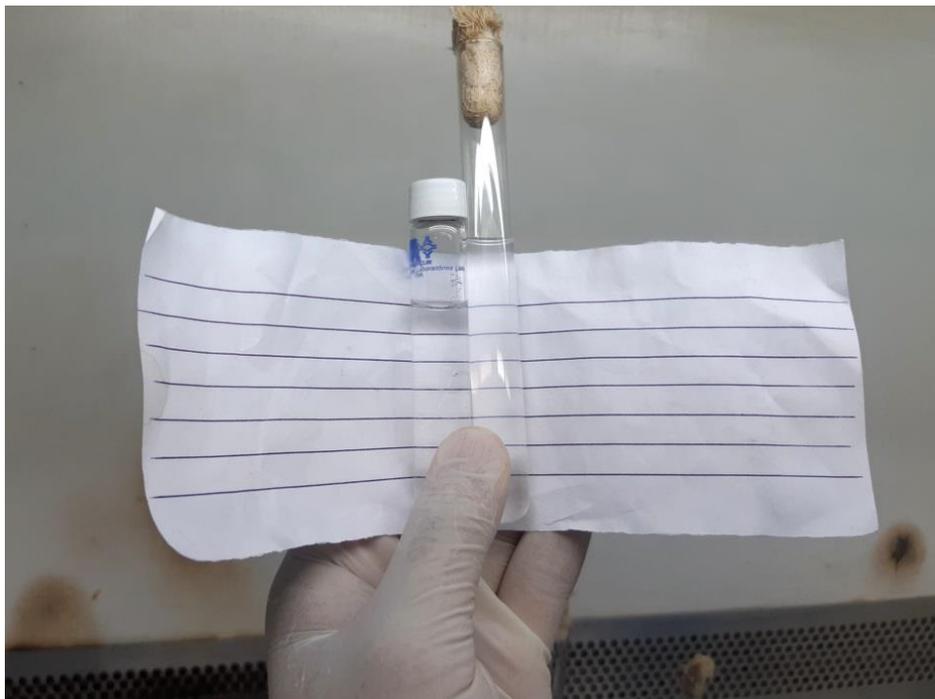
APÊNDICE C: Cultura, desenvolvimento do biofilme e contagem das unidades formadoras de colônias.

Figura 15 - Inócuo bacteriano de *S. aureus*.



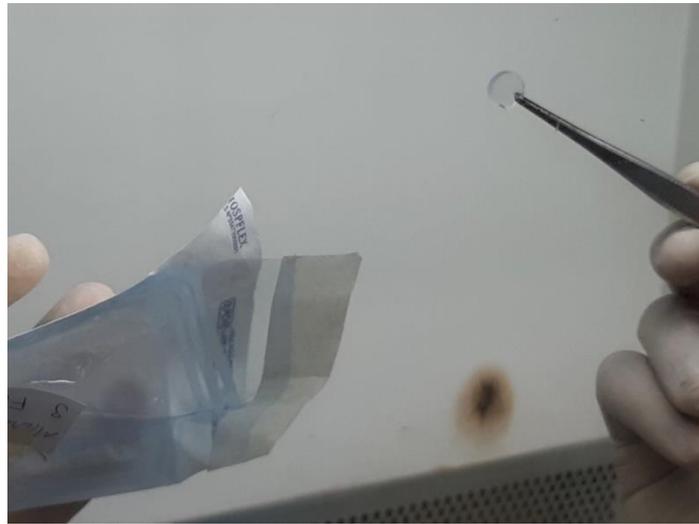
FONTE: Arquivo pessoal

Figura 16 - Comparação do método visual de *Mc Farland*.



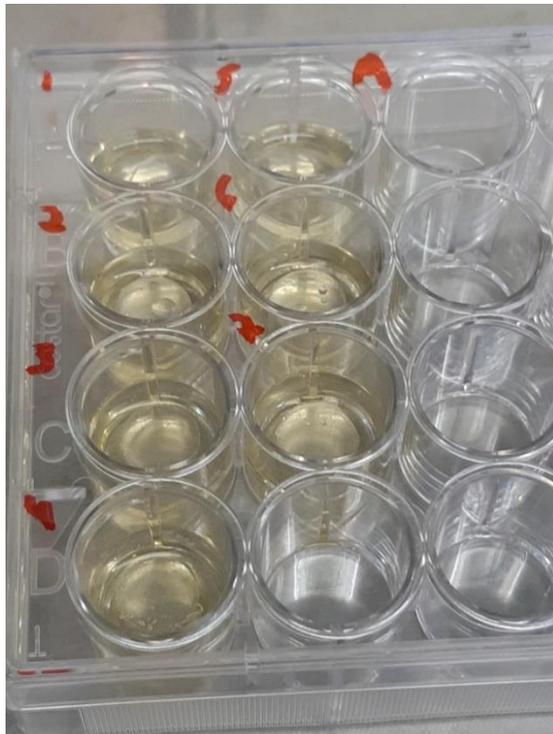
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 17 - Retirada dos espécimes esterilizados dos pacotes com pinça esterilizada.

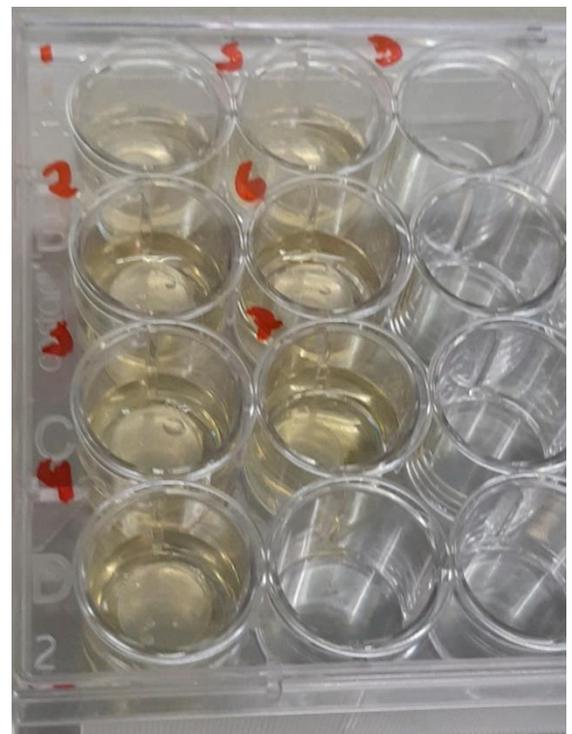


FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 18 - Placa de 24 poços com espécimes de silicone imersos em caldo BHI com *S. aureus*, na concentração de 10^8 células/mL. FIGURA A RTV (Silicone Grau Médico MDX 4-4210, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA), e FIGURA B HCR (Silicone Grau Médico Q7-4735, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA).



(A)



(B)

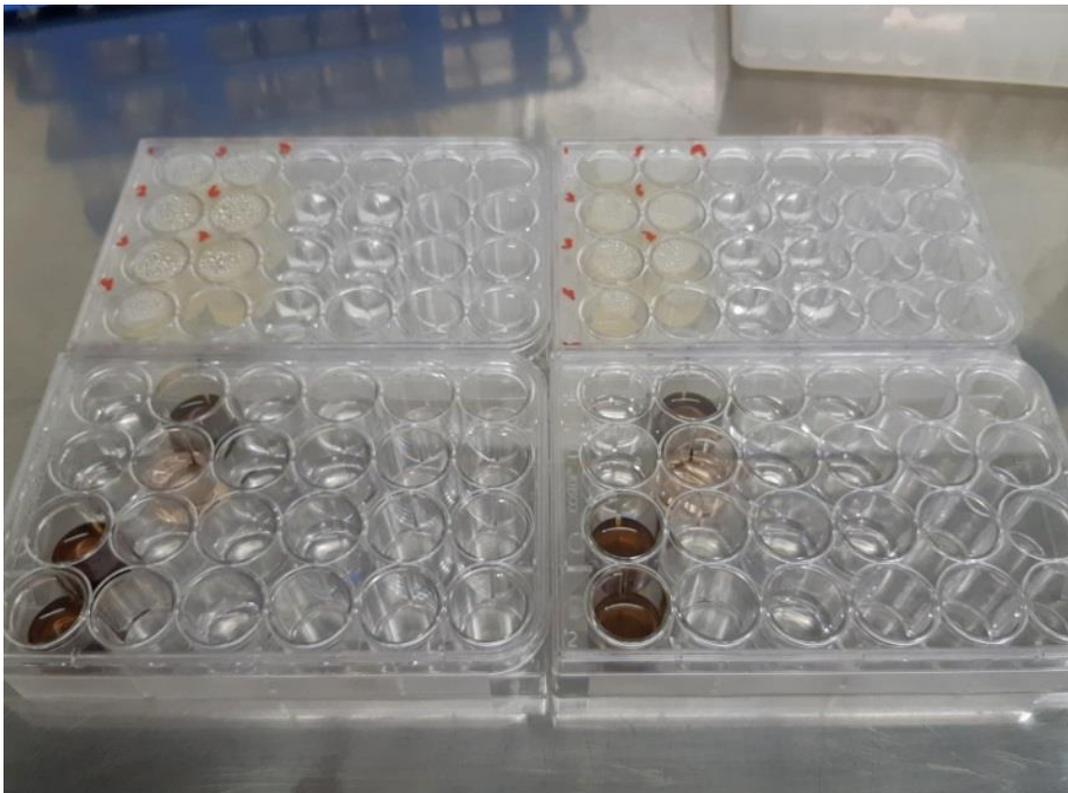
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 19 - Incubação a 35°C das placas de 24 poços por 24 horas.



FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 20 - Placa de 24 poços contendo os espécimes com o biofilme formado sobre a superfície destes, após 24 horas de incubação a 35°C.



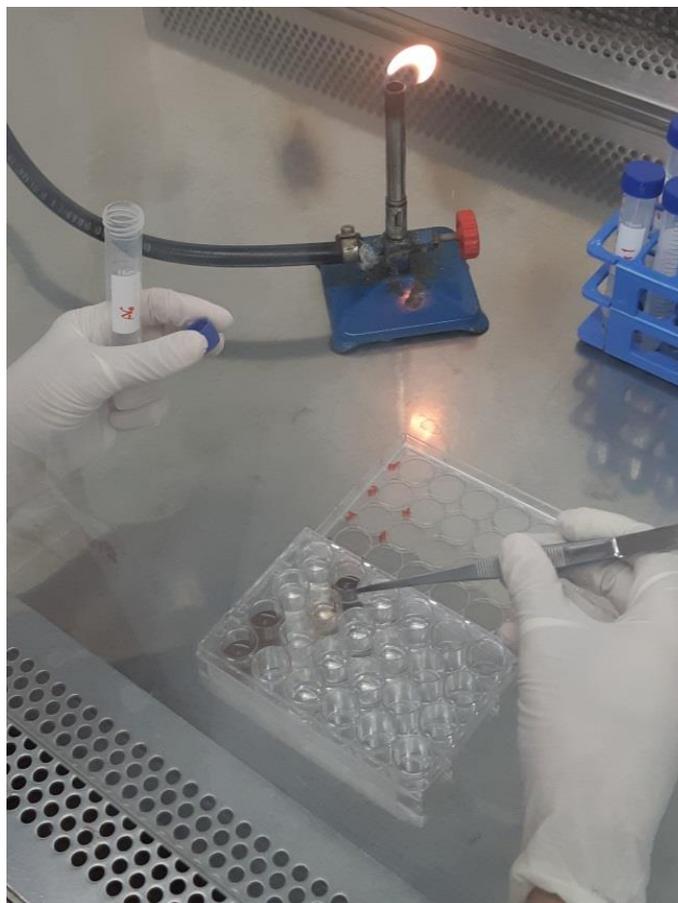
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 21 - Desinfecção dos espécimes após desenvolvimento do biofilme.



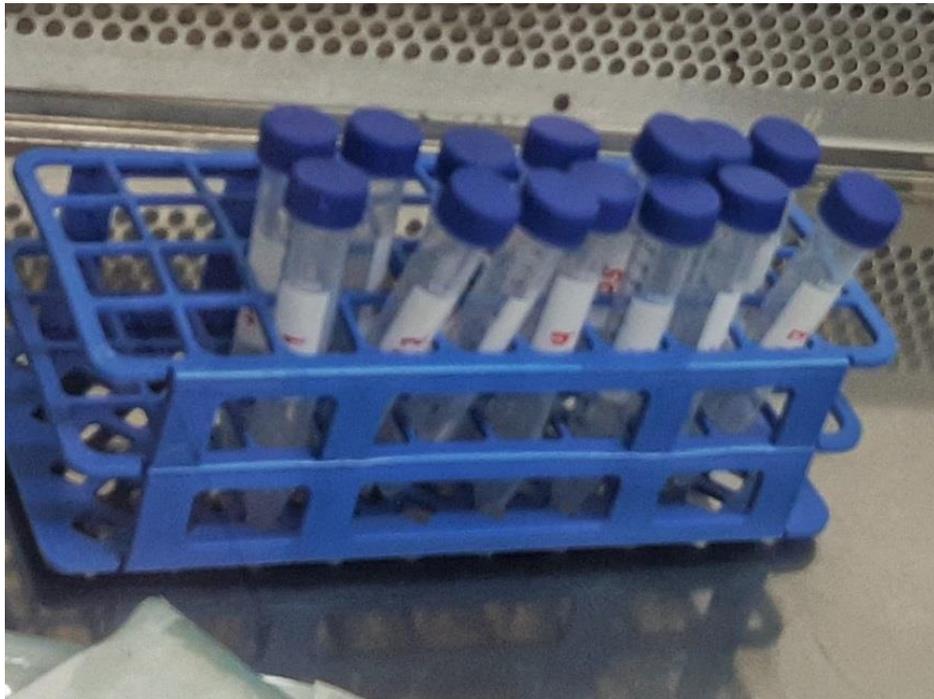
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 22 - Lavagem dos espécimes.



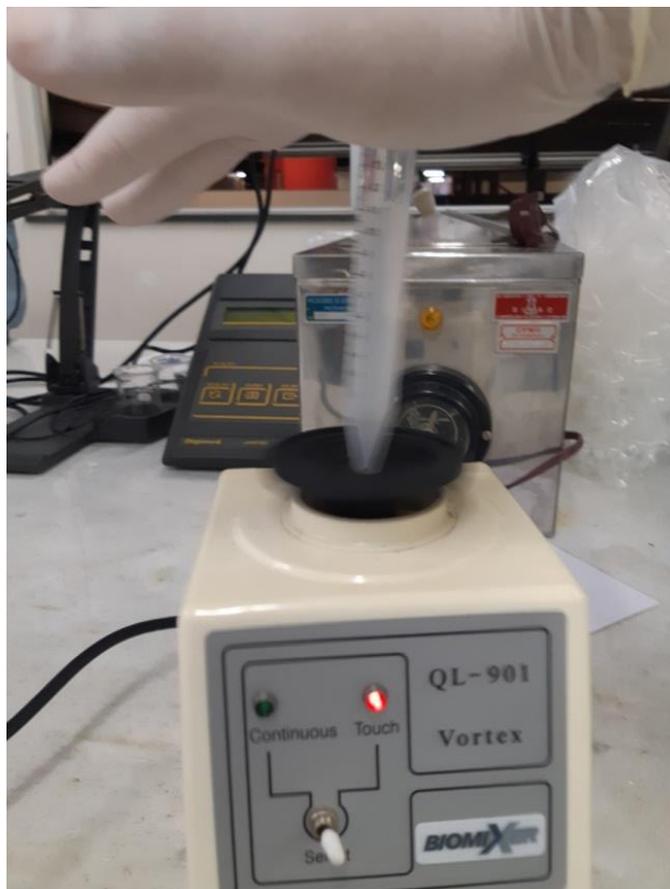
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 23 - Pellet bacteriano em tubo *Falcon*™.



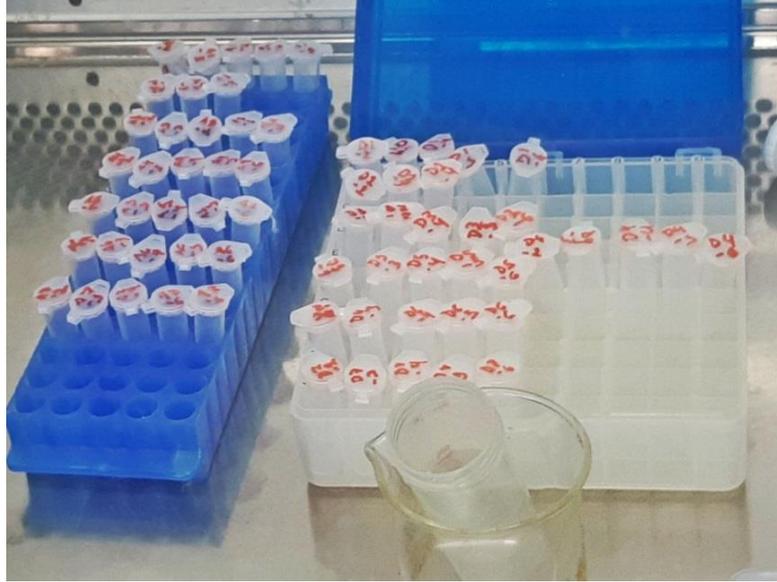
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 24 - Processo de agitação pelo Vortex.



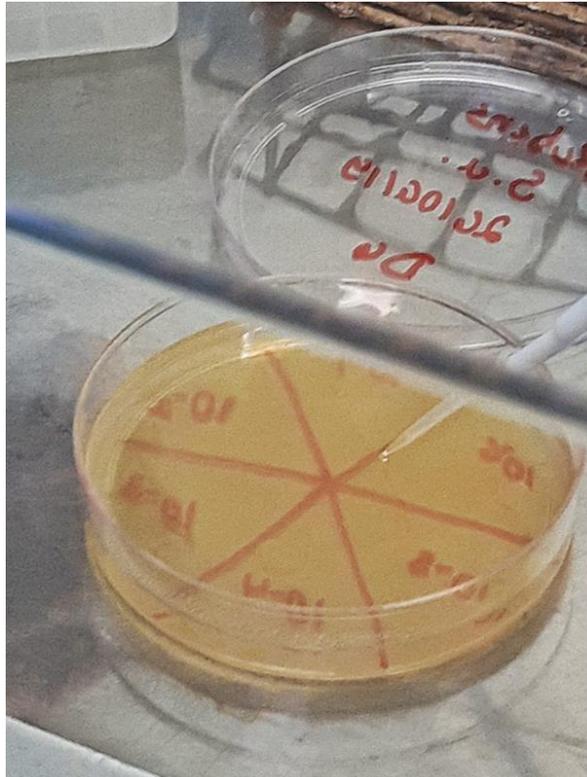
FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 25 - Procedimento de diluição seriada em salina: (A) transferência de 100 μ L da solução agitada contendo os espécimes para os ependorfs. (B) Cada ependorf conteve 900 μ L de salina + 100 μ L da solução transferida.



FONTE: Arquivo pessoal.

Figura 26 - Aplicação da técnica da microgota para a contagem de células por mililitro.



FONTE: Arquivo pessoal.