UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Luíza Costa Silva Freire

EFEITO DO PRÓPOLIS NAS PROPRIEDADES DE REEMBASADORES RESILIENTES UTILIZADOS EM PRÓTESES OBTURADORAS

Belo Horizonte – MG

2018

Luíza Costa Silva Freire

EFEITO DO PRÓPOLIS NAS PROPRIEDADES DE REEMBASADORES RESILIENTES UTILIZADOS EM PRÓTESES OBTURADORAS

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

Orientadora: Profa. Dra. Amália Moreno

Belo Horizonte – MG

2018

AGRADECIMENTOS

Este trabalho simboliza a conclusão de uma etapa crucial para minha vida acadêmica e profissional e foi fruto de muita dedicação, paciência e zelo. Ele nunca teria sido concluído sem a ajuda de pessoas muito especiais. Em primeiro lugar agradeço a Deus por me conceder resiliência e serenidade nos mais diversos momentos de desânimo e por me presentar com pessoas tão maravilhosas. À minha mãe e minha irmã por todo o suporte que me deram durante o desenvolvimento desta pesquisa, desde as noites em claro aos fins de semana na faculdade ; ao meu pai por todos os ensinamentos e apoio ; ao meu namorado que me tranquilizava a cada crise de ansiedade e que me ajudou de diferentes formas na construção deste trabalho. Ao amigo Nickolas que dividiu comigo tantas experiências, do internato rural à escrita do TCC, e a cada um dos meus amigos que deixam a vida mais leve e divertida e que compreenderam minhas ausências com empatia. Agradeço a Profa. Amália e ao Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, na pessoa do Prof. Carlos Augusto Rosa e Profa. Susana Johann, por compartilharem seus conhecimentos e tornarem possível a realização dos testes microbiológicos ; e especialmente às meninas do grupo de Antifúngicos que me receberam tão bem e me ensinaram tanto.

RESUMO

Os materiais utilizados para a confecção da área do defeito palatino/bulbo faríngeo em próteses restauradoras intra-orais obturadoras podem tornar-se meio de cultura propício para o desenvolvimento da estomatite protética. O objetivo deste estudo foi avaliar a dureza e o efeito antifúngico de dois reembasadores resilientes submetidos à desinfecção com extrato glicólico de própolis verde brasileiro, comparado com substâncias convencionais. Para isso foram confeccionados 344 discos de material reembasador resiliente (10 mm em diâmetro e 2 mm em espessura), sendo 200 utilizados para o teste de dureza e 144 para os testes microbiológicos. Os discos foram confeccionados de acordo com o tipo de material (a base de resina- Soft Confort ou silicone- Ufi Gel P) e método de polimerização (autopolimerizável ou termopolimerizável). Foram então testados com algumas soluções durante 15 min: solução glicólica de própolis verde, nas concentrações de 11%, 16% e 20% ; hipoclorito de sódio a 1% como controle negativo; e água destilada como controle positivo. Todos os discos foram aleatoriamente distribuídos aos grupos de tratamentos, sendo n=10 para o teste de dureza, e n=6 para os testes microbiológicos. Para o teste de dureza foram realizadas leituras iniciais, e após 24 horas durante um período total de 3 dias de tratamento, por meio do durômetro Shore A. Para a avalição microbiológica amostras de *Candida albicans* foram utilizadas e submetidas a 48 horas de crescimento e desenvolvimento do biofilme sobre a superfície dos discos revestidos por saliva. Todos os discos foram sonicados para desagregar o biofilme implantado e foi relizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ mL). Todos os dados obtidos no estudo foram submetidos à análise estatística por meio de testes paramétrico e não paramétricos. Os resultados apresentaram ampla eficácia antifúngica das soluções de própolis verde semelhante ao hipoclorito de sódio a 1% para todos os materiais. Na avalição da dureza os materiais apresentaram redução dos valores de dureza ao longo do período de desinfecção. Os discos testados com hipoclorito de sódio a 1% apresentaram menores valores médios de dureza, comparados aos outros testes ao final de 72 horas. Pode-se concluir que o extrato glicólico de própolis verde é eficaz na erradicação do biofilme fúngico, no entanto pode alterar a dureza a longo prazo de desinfecção.

Palavras-chaves: Prótese maxilofacial. Reembasadores de dentadura. Dureza. Biofilmes. Desinfecção. Própole.

ABSTRACT

The materials used to reconstruct the soft palate and velopharyngeal orifice in intra-oral restorative prosthesis may become a culture medium conducive to the development of prosthetic stomatitis. The purpose of this study was to test the efficacy of solutions based on green propolis glycolic extract, compared to conventional solutions in the removal of biofilm in denture soft liners surface, as well as evaluate the effects of these solutions on the hardness of these materials. 344 circular specimens of soft liner material (10 mm in diameter and 2 mm in thickness) were made, 200 of which were used for the hardness test and 144 for microbiological tests. The specimens were made according to the type of material (resin base - Soft Confort or silicone base - Ufi Gel P) and polymerization method (self-curing-direct or polymerized by hot water bath-indirect). The specimens were tested with the solutions proposed in the study for 15 min: green propolis glycolic extract at concentrations of 11%, 16% and 20%; 1% sodium hypochlorite as a negative control; and distilled water as a positive control. All the specimens were randomly assigned to the treatment groups, being n = 10 for the hardness test, and n = 6 for the microbiological tests. For the hardness test, initial readings were performed and after 24 hours during a period of 3 days of treatment using the Shore A durometer. For the microbiological evaluation, samples of *Candida albicans* were used and submitted to 48 hours of growth and development of the biofilm on the surface of the specimens coated by saliva. All specimens were sonicated to disaggregate the implanted biofilm and for the quantitative evaluation of the biofilm the number of colony forming units (CFU / mL) was estimated. All data obtained in the study were submitted to statistical analysis using parametric and non-parametric tests. The results showed broad antifungal efficacy of propolis solutions similar to 1% sodium hypochlorite for all materials. In the hardness evaluation the materials presented reduction of hardness values throughout the disinfection period. Specimens tested with 1% sodium hypochlorite had lower mean hardness values compared to the other solutions at the end of 72 hours. It can be concluded that the glycolic extract of green propolils is effective in eradicating the fungal biofilm, however it may alter the hardness in a long-term disinfection.

Keywords: Maxillofacial prosthesis. Denture liners. Hardness. Biofilms. Disinfection. Propolis.

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)
mL	= mililitro (unidade de medida equivalente a 10^{-3}L)
µl	= microlitro (unidade de medida equivalente a 10^{-6}L)
min	= minuto
h	= hora
psi ou lb/in²	= pound force per square inch ou libra-força por polegada
g	= grama (o grama)
Ind. Com. Ltda.	= Indústria e Comércio Limitada
CRTA	= água destilada como controle positivo
HIP1	= hipoclorito de sódio a 1%
SGP11	= solução glicólica de própolis verde a 11%
SGP16	= solução glicólica de própolis verde a 16%
SGP20	= solução glicólica de própolis verde a 20%
PVB	= Própolis verde brasileira
%	= porcentagem
°C	= Graus Celsius
SP	= São Paulo
MG	= Minas Gerais
RJ	= Rio de Janeiro
EUA	= Estados Unidos da América
TCC	= Trabalho de conclusão de curso
UFC/mL	= unidades formadoras de colônia por mililitro
ANOVA	= análise de variância
ln	= logarítimo natural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……. 8
2 OBJETIVOS……...……... 12
2.1. Objetivo geral……...…12
2.2. Objetivos específicos…….....…...……12
3 METODOLOGIA……... 13
3.1. Confecção dos discos……..... 13
3.2. Procedimentos de desinfecção ...……14
3.3. Avaliação da dureza Shore A……...14
3.4. Avaliação microbiológica ……...15
3.4.1. Preparação dos microrganismos……...…15
3.4.2. Implantação do biofilme e desinfecção……... 15
3.4.3. Contagem das células do biofilme……... 16
3.5. Análise estatística……...……... 16
4 RESULTADOS……..… 18
5 DISCUSSÃO……...…21
6 CONCLUSÕES……..…….....25
REFERÊNCIAS…….....26
APÊNDICES……...……..29

1 INTRODUÇÃO

A odontologia possui papel crucial nos processos de reconstrução e reabilitação maxilofacial em pacientes portadores de malformações congênitas, mutilações traumáticas ou patológicas e distúrbios de desenvolvimento maxilofaciais. A confecção de próteses intra e extra-orais (faciais) com materiais aloplásticos permite a reabilitação do paciente, devolvendo a anatomia, função e estética, além de auxiliar na terapia psicológica.

As próteses obturadoras de palato e faringe são dispositivos para obliterar aberturas de palato congênita ou adquiridas, que podem ser pequenas ou não, e incluir alguma porção do palato duro e mole, crista alveolar e soalho da cavidade nasal. Estas aberturas podem ser resultado de agentes traumáticos, doenças, variações patológicas, radiações ou intervenções cirúrgicas (GOIATO *et al*., 2011 ; JOSEPH *et al.*, 2015). Quando a reconstrução cirúrgica destes defeitos é contra-indicada, o tratamento reabilitador proposto é a confecção de próteses parciais ou totais removíveis obturadoras, que visam corrigir distúrbios estéticos, funcionais (sucção, deglutição, respiração, fonação, audição, mastigação) e melhorar a condição psicológica, emocional e o bem-estar do paciente (BEUMER *et al.*, 2011).

Para a confecção de uma prótese obturadora é necessário que o material utilizado suporte desafios químicos, seja biocompatível, resistente, estável, e o mais confortável para o paciente quanto possível. Para proporcionar melhor adaptação e conforto aos pacientes utiliza-se materiais reembasadores resilientes, que consistem em um material polimérico colocado na superfície em contato com a mucosa de uma base de uma prótese, agindo como uma espécie de amortecedor entre as superfícies oclusais da prótese e os tecidos orais subjacentes, e, no caso das aberturas, obliterando-as (ANUSAVICE *et al.*, 2013).

Os reembasadores resilientes se dividem em dois grupos principais: resinas acrílicas macias e silicones, sendo disponíveis nas formas térmica e quimicamente ativadas. Os materiais constituídos de resina acrílica usam o polimetilmetacrilato ou o polietilmetacrilato como os componentes estruturais principais. Esses polímeros são fornecidos na forma de pó, que então é misturado ao líquido, que contém plastificantes, que geralmente é uma molécula de alto peso molecular, como o álcool por exemplo. Estes reembasadores resilientes são considerados de curto prazo, pois o líquido utilizado não contém monômeros acrílicos (MANCUSO *et al.*, 2009, 2012). Os reembasadores resilientes considerados de longa duração são termicamente ativados, e quando

fornecidos em sistema pó-líquido, o líquido possui monômeros acrílicos, além do plastificante. Sugere-se que a maciez inicial do material constituído de resina acrílica é devido à grande quantidade de plastificante presente no líquido, cuja distribuição de moléculas permite que cadeias individuais de polímero deslizem umas sobre as outras, garantindo ao material o caráter resiliente, tendo efeito amortecedor sobre os tecidos subjacentes. O plastificante é utilizado para diminuir a temperatura de transição vítrea do polímero "de modo que a quantidade de deformação permanente do material resiliente seja reduzida para um nível satisfatório" (ANUSAVICE *et al.*, 2013).

Tem-se sugerido que os reembasadores resilientes não sustentam crescimento micótico por si próprios, mas os restos alimentares aprisionados nos poros dos materiais deixam o meio propício para o crescimento microbiano. O fungo mais comumente encontrado nesses materiais (e na cavidade oral) é *Candida albicans,* que é uma levedura que faz parte da microbiota normal do hospedeiro e só é capaz de provocar uma infecção quando ocorre um desequilíbrio entre hospedeiro e parasita, isto é, susceptibilidade do hospedeiro juntamente com fatores de virulência do microrganismo (MONTEIRO *et al.*, 2014). Em pacientes imunocomprometidos por drogas imunossupressoras, antibióticos, quimio ou radioterapias, distúrbios sitêmicos, etc; a infecção oral por Candida é comum (MATTOS *et al*., 2009). A maioria dos pacientes que fazem uso de próteses obturadoras são pessoas que passaram por um tratamento imunossupressor, e por isso devem ter atenção especial à desinfecção das próteses, pois a má higiene oral, bem como a limpeza defeituosa da prótese, tendem a piorar o quadro infeccioso.

Os principais produtos de escolha para desinfecção de próteses atualmente são o hipoclorito de sódio e a clorexidina (RODRIGUEZ *et al*., 2015), que apesar de se mostrarem bons agentes de controle do biofilme, podem causar danos ao materiais que constituem a prótese com o uso prolongado, considerando sua desinfecção periódica a cada 15 dias ao longo de 5 anos, tempo de vida útil desta prótese. Além do aumento da rugosidade de superfície (PARANHOS *et al*., 2013) os vestígios de desinfetante que ficam retidos nos poros da prótese, mesmo após o exágue, podem ser nocivos para os tecidos orais. Como é ressaltado por Procópio *et al*. (2018) os resíduos químicos da clorexidina podem ser tóxicos para a mucosa que fica em contato com a prótese, mesmo após lavada e enxaguada. Diante deste cenário, a própolis representa potencial e promissor agente de desinfecção, tendo como vantagem suas características antimicrobianas, ser economicamente viável; além de sua baixa toxicidade, podendo ser usada como terapia tópica em pacientes com candidíase oral (SANTOS *et al*., 2005). Contudo, assim como

ocorre com os cereais, uma grande variedade de microrganismos pode se desenvolver no pólen de abelhas, incluindo fungos produtores de micotoxinas que podem causar danos à saúde humana (GONZÁLEZ *et al*., 2005). Por isso, faz-se necessário o rigoroso monitoramento da qualidade higiênica e concentração de pesticidas e agrotóxicos nos extratos de própolis verde, a fim de garantir a segurança do seu uso.

A própolis é uma substância presente na resina que as abelhas produzem para selar e proteger a colmeia da umidade, calor, luz, patógenos. Ela vem sendo amplamente utilizada pelo ser humano no mundo inteiro há anos (AL-WAILI *et al.*, 2012). Hoje estuda-se suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumoral, antioxidante, anestésica, antidiabéticos, espasmolíticos, anestésicos e efeitos imunomoduladores (AL-WAILI *et al.*, 2012; BARLAK *et al.,* 2011). A própolis é o mecanismo de defesa das abelhas contra infecções, o que sugere sua promissora ação antimicrobiana e antifúngica, o que já foi demonstrado em várias amostras (SFORCIN, 2016; BANKOVA, 2005).

Embora existam atualmente no mercado alguns produtos já bem estabelecidos de higienização para próteses intra-orais, não se tem o mesmo para desinfecção de materiais em contato com secreção das regiões ressecadas da arcada maxilar. A grande maioria dos estudos são direcionados à limitação da microbiota aderida aos materiais convencionais utilizados em próteses dentárias. Adicionalmente, deve-se considerar a especificidade da microbiota patogênica na região de bordas cirúrgicas em pacientes portadores de defeitos maxilofaciais, bem como a possibilidade dos materiais softs utilizados no prolongamento destas próteses.

Assim, a execução desta pesquisa se justifica pela necessidade de mais estudos, a fim de buscar soluções alternativas e eficazes para a desinfecção das próteses parciais e totais removíveis obturadoras de palato e faringe. A higienização das próteses obturadoras deve ser feita diariamente e há uma grande necessidade de se encontrar um material capaz de realizar uma desinfecção eficiente com a mínima alteração possível da prótese e que seja acessível à população. Deve-se ressaltar que o tratamento com própolis é inovador e a substância vem sendo considerada promissora na odontologia. O trabalho em questão é original e vem contribuir de forma expressiva com os trabalhos desenvolvidos pelos pesquisadores e clínicos. Sabe-se que, no Brasil, poucos são os profissionais que atuam na área da Prótese Bucomaxilofacial e muitos são os pacientes que necessitam desses cuidados. Isso faz com que exista a necessidade de buscar maior conhecimento científico para dar respaldo ao atendimento clínico realizado, o que reflete diretamente na melhora da qualidade de vida deste público alvo. Os resultados obtidos

nesta pesquisa serão de extrema importância, visto que irão esclarecer sobre as propriedades de um agente desinfetante em potencial, ainda pouco estudado, além de interferir diretamente no trabalho do profissional dentista e no cotidiano do paciente e como ele realiza a limpeza de sua prótese.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia de soluções à base de extrato glicólico de própolis verde comparativamente às soluções convencionais na remoção do biofilme de *Candida albicans*, desenvolvido em superfície de materiais reembasadores resilientes, e também avaliar a dureza desses materiais de uso em próteses parciais ou totais removíveis obturadoras de palato e faringe.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a eficácia de ação desinfetante da solução de extrato glicólico de própolis verde, variando a concentração, na remoção do biofilme de *Candida albicans*, sobre a superfície de dois reembasadores resilientes de acordo com ambos os métodos de polimerização propostos pelo fabricante.
- Verificar *in vitro* a dureza de dois reembasadores resilientes de acordo com ambos os métodos de polimerização propostos pelo fabricante antes e após o tratamento com solução de extrato glicólico de própolis verde.

3 METODOLOGIA

3.1. Confecção dos discos

Para este estudo foram confeccionados 344 discos de materiais reembasadores resilientes. Para a sua padronização, foi utilizada matriz metálica vazada na espessura de 2 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada. Para o teste de dureza foram utilizado 200 discos, e 144 discos para os testes microbiológicos. Os discos foram confeccionados de acordo com o tipo de material (a base de resina - Soft Confort - ou silicone - Ufi Gel P) e variação do método de polimerização (autopolimerizável – direto - ou termopolimerizável - indireto).

Para a confecção dos discos dos materiais autopolimerizáveis a matriz metálica foi posicionada entre duas placas de vidro (80 mm x 35 mm x 3 mm), sendo ambas isoladas com produto à base de alginato (Cel-Lack, Brasil) para que o material não se aderisse às placas de vidro após sua polimerização. Especificamente para o reembasador à base de silicone (Ufi Gel P), o produto só foi utilizado para isolar as bordas da matriz que entrar em contato com o material. Em seguida, as proporções da base/catalisador de cada material foram misturadas com uma espátula de aço inoxidável de acordo com as instruções do fabricante, sobre placa de vidro ou pote plástico, em temperatura ambiente de 23 (± 2ºC) e umidade relativa de 50 (± 10%). Após a obtenção de uma mistura homogênea do material, esta foi inserida no interior da matriz metálica e o conjunto levado a prensa hidráulica (Midas Dental Products Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com força de 1,2Kg/F durante 10 minutos. Após isso, os discos de silicone permaneceram em repouso. Todos os discos foram armazenados a seco na ausência total de luz.

Para a confecção dos discos dos materiais termopolimerizáveis 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, Brasil) e preenchida com gesso pedra (Tipo III; 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, sendo que uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) permaneceu 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 lâmina de vidro com as mesmas dimensões da anterior foi posicionada sobre a matriz e fixada em suas extremidades com elastômero de silicone polimerizado por condensação (Zetalabor;

Zhermack, Alemanha). 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 lâmina de vidro foi vertido gesso especial tipo III. 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. Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a superfície de ambos os vidros foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, as proporções da base/catalisador do reembasador resiliente foram misturadas com uma espátula de aço inoxidável sobre papel ou pote de plástico, em temperatura ambiente de 23 (± 2ºC) e umidade relativa de 50 (± 10%), de acordo com as instruções do fabricante. Após a obtenção de uma mistura homogênea do material, 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 reembasador resiliente à base de resina (Soft Confort) a mufla foi levada à polimerizadora (Polimerizadora elétrica; Metal Vander, Jaraguá, SP, Brasil), sob pressão de aprox. 60 libras, seguindo o ciclo até atingir 120ºC. Então, foi desligada até atingir 60ºC e religada até atingir 120ºC novamente, devendo então ser desligada e resfriada naturalmente. Após total resfriamento da mufla, os discos foram desincluídos, e permaneceram em repouso, à temperatura ambiente. Para a polimerização do reeembasador resiliente à base de silicone (Ufi Gel P) a mufla foi ser levada à polimerizadora durante 15 minutos, à uma temperatura de 40 a 45ºC e posteriormente arrefecida por 20 minutos.

3.2. Procedimentos de desinfecção

Os procedimentos de desinfecção foram realizados com as soluções propostas durante 15min: solução glicólica de extrato de própolis verde (BEE PROPOLIS, SP, Brasil) de acordo com a concentração (11%, 16% ou 20); solução de hipoclorito de sódio a 1% (LENZAFARM, MG, Brasil) (controle negativo); solução de água destilada (controle positivo). Todos os discos foram aleatoriamente distribuídos aos grupos testados para cada substância proposta, sendo n=10 para os testes de dureza, e n=6 para os testes microbiológicos.

3.3. Avaliação da dureza Shore A

A leitura da dureza dos discos foi realizada incialmente por meio do durômetro

Shore A (Mitutoyo Digital HH-336, Hardmatic Durometer). Após isso, os discos foram imersos nas soluções propostas durante 72h (3 dias) em temperatura ambiente. Durante este período as soluções foram repostas diariamente e as leituras de dureza foram realizadas ao final de cada 24h, sendo que os discos foram lavados com água destilada e secos com papel absorvente. Esta imersão por 3 dias corresponde a desinfecção de 15 minutos realizada aprox. 288 vezes (NAKAHARA *et al*., 2013).

3.4. Avaliação microbiológica

3.4.1. Preparação dos microrganismos

As amostras de *Candida albicans* SC 5314 (LI *et al*., 2007) foram utilizadas neste estudo e cultivadas aerobicamente por 48h a 37°C em meio Agar Sabouraud dextrose. Para o preparo do inócuo, as amostras foram suspendidas em solução salina (NaCl) estéril e ajustadas a uma densidade óptica de 0.3 a 540 nm de comprimento, com o auxílio de um espectofotômetro (SP22 ; Biospectro, SP, Brasil), resultando em uma suspensão de concentração final correspondente a 1,1 x 10^7 UFC/mL (SUSEWIND *et al*., 2015 ; YILDIRIM-BICER *et al*., 2014).

3.4.2. Implantação do biofilme e desinfecção

Para a formação do biofilme, foi coletada saliva de um adulto saudável, por expectoração que assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente a esta pesquisa. A coleta foi realizada em tubos falcon, em diferentes ocasiões de um mesmo dia para minimizar as variações intraindividuais na composição da saliva (SUSEWIND *et al*., 2015). A saliva foi congelada imediatamente após a coleta a -30°C. Para a esterilização da saliva foram utilizados filtros com poros de 0.22 *µm* acoplados a uma bomba de vácuo, e em seguida a saliva foi aliquotada em tubos falcon de 15mL e na sequência recongelada.

Imediatamente antes do experimento, a saliva humana foi cuidadosamente descongelada. Em fluxo laminar, os discos foram retirados do envelope de esterilização com o auxílio de uma pinça estéril e, sob condições assépticas, transferidos individualmente e na posição horizontal para uma placa de cultura de 24 poços, sendo cada um incubado com 1 mL de saliva humana por 2h a 37°C sob agitação de 75 rpm em uma Câmara Incubadora com Agitação Orbital (TE-4200; Tecnal, SP, Brasil), para a formação de uma película adquirida sobre as suas superfícies (SUSEWIND *et al*., 2015). Posteriormente, os discos foram lavados com 1 mL de solução salina estéril para remover

os resíduos de saliva. Em seguida 1mL de inóculo de *Candida albicans* foi adicionado em cada de poço da placa, e os discos foram novamente incubados a 37°C sob agitação de 75 rpm durante 90 minutos para adesão da amostra fúngica à película adquirida na superfície dos discos (KARAKIS *et al*., 2016). Após esta fase, os discos foram cuidadosamente lavados duas vezes, com 1 mL de solução salina estéril de cada vez, para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, foi adicionado a cada poço 2 mL do meio líquido RPMI para o crescimento do biofilme (KUCHARÍKOVÁ *et al*., 2011), e o material incubado a 37°C sob agitação de 75 rpm durante 48h.

Após este período, o meio RPMI foi removido cuidadosamente, e em seguida aos poços foram adicionadas as soluções desinfetantes de forma que os discos permaneçam imersos durante o período proposto. Após a desinfecção dos discos, as soluções foram removidas, e em seguida os dicos foram lavados cuidadosamente com 1 mL de solução salina estéril para remoção do excesso dos componentes das soluções desinfetantes.

3.4.3. Contagem das células do biofilme

Para o desprendimento do biofilme aderido aos discos, as placas de 24 poços contendo os discos imersos em 1 mL de solução salina estéril foram sonicadas (Quimis, SP, Brasil) durante 30 segundos. Em seguida, as soluções foram aspiradas e transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL e diluídas em série em solução salina estéril. Cada 20 µL de diluição foram semeado no meio Agar Sabouraud dextrosado sólido e espalhados com o auxílio de uma alça drigalsky em placa petri. As placas petri foram incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24 e 48 horas em condições de aerobiose. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi estimado de uma contagem entre 30 e 300 de UFC (MONTEIRO *et al*., 2014). Para maior confiabilidade dos resultados, os testes foram realizados em duplicata, sendo 2 discos para cada tipo de material e métodos de polimerização, e em 3 dias/experimentos independentes.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados com o software SPSS (versão 17). Os dados foram avaliados para a verificação de distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Friedmnan foi aplicado para os dados não normais de CFU/mL para os resultados do grupo controle (positivo). A Análise de Variância (ANOVA) três-fatores medidas repetidas foi realizada para verificar a diferença significante entre os fatores analisados: material, tratamento e período. As diferenças significantes nos valores obtidos

na ANOVA foram comparados por teste de Tukey-Kramer HSD em nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

Os discos tratados com as soluções propostas no estudo não apresentaram UFCs para os períodos de semeadura de 24 e 48 h de incubação em condições de aerobiose (Figura 1). Estes resultados destacam a ampla eficácia das soluções de própolis de 11, 16 e 20% semelhante ao hipooclorito de sódio a 1% na atuação sobre o o biofilme fúngico da cepa de *Candida albicans*. Os valores de UFC relacionados aos controles são apresentados na figura 1. Pode-se verificar maiores valores de UFC para o material à base de resina Soft Confort autopolimerizável (1,04E+06) em relação aos demais materiais avaliados (Teste de Friedman, $P<0,05$) (Figura 2).

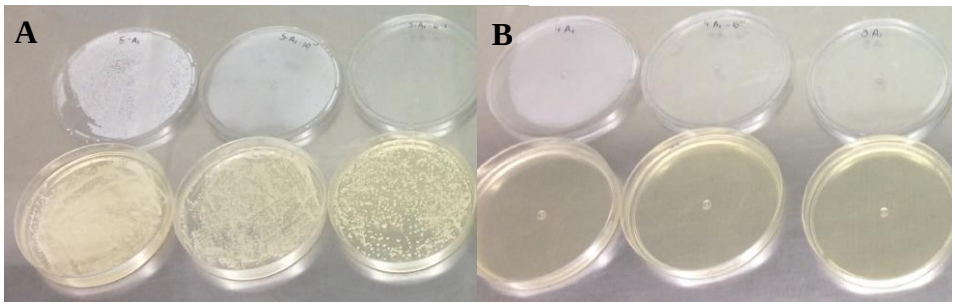

Figura 1. Placas Petri com a (A) presença (controle com 5 diluições) e (B) ausência (3 concentrações de soluções de extrato glicólico de própolis e hipoclorito de sódio a 1% com 1 diluição) de colônias formadas por mililitro.

FONTE: Arquivo Pessoal

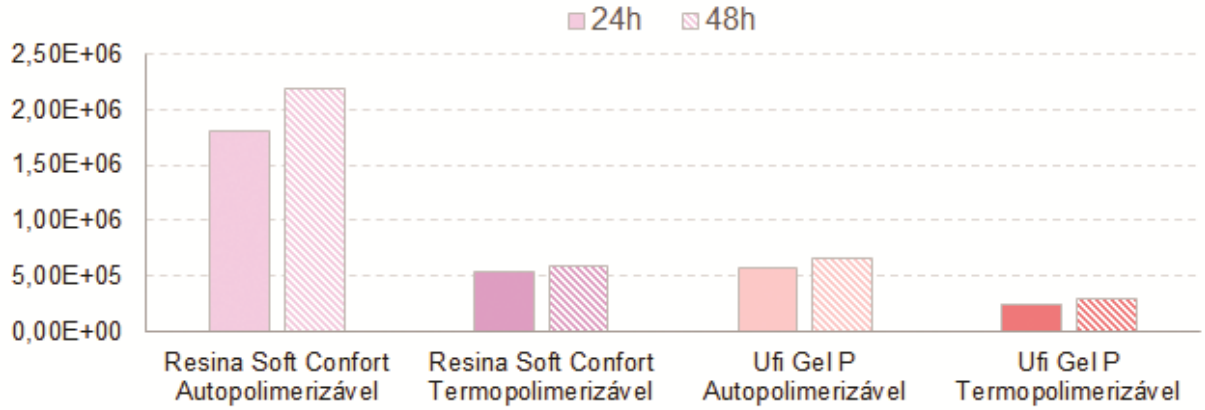

Figura 2. Valores médios de UFC/mL do biofilme desenvolvido na superfície de materiais reembasadores resilientes e avaliados após 24 e 48 horas de semeadura em condições de aerobiose.

FONTE: Arquivo Pessoal

No teste ANOVA três fatores medidas repetidas para os valores médios de dureza Shore A, pode-se verificar diferença estatística significativa na interação entre todos os fatores : material, solução desinfetante e período (*P*<0,05, ANOVA) (tabela 1). Pode-se verificar maiores valores de dureza para o material à base de resina Soft Confort em relação ao material à base de silicone Ufi Gel P, com diferença estatística significante (*P*<0,05, ANOVA, figura 3). O material Ufi Gel P apresentou os menores valores de dureza com diferença estatística em relação ao material Soft Confort em ambos os tipos de polimerização (*P*<0,05, ANOVA, figura 3).

Além disso, ao final do período de 72 horas houve diminuição dos valores de dureza para todos os materiais avaliados independente da solução desinfetante utilizada (*P*<0,05, ANOVA, figura 3). Em relação à desinfecção, os discos imersos em hipoclorito de sódio a 1% apresentaram menores valores de dureza estatisticamente diferentes dos demais, no período de 72 horas (*P*<0,05, ANOVA, figura 3).

Fator de variação	***gl***	**SQ Ajustada**	**MQ Ajustada**	**F**	***P***
Material	3	93444,00	31148,00	1096,86	<0,001*
Solução desinfetante	4	357,77	89,44	3,15	<0,016*
Material × Solução desinfetante	12	1268,77	105,73	3,72	<0,001*
Entre amostras	180	5111,52	28,40		<0,001*
Período	3	9704,24	3234,75	257,97	<0,001*
Material × Período	9	9224,32	1024,92	81,74	<0,001*
Solução desinfetante × Período	12	414,39	34,53	2,75	0,001*
Material × Solução desinfetante × Período	36	1137,59	31,60	2,52	<0,001*
Intra amostras	552	6921,68	12,54		<0,001*

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

Tabela 1. Resultados de Anova 3 fatores medidas repetidas para valores médios de dureza Shore A.

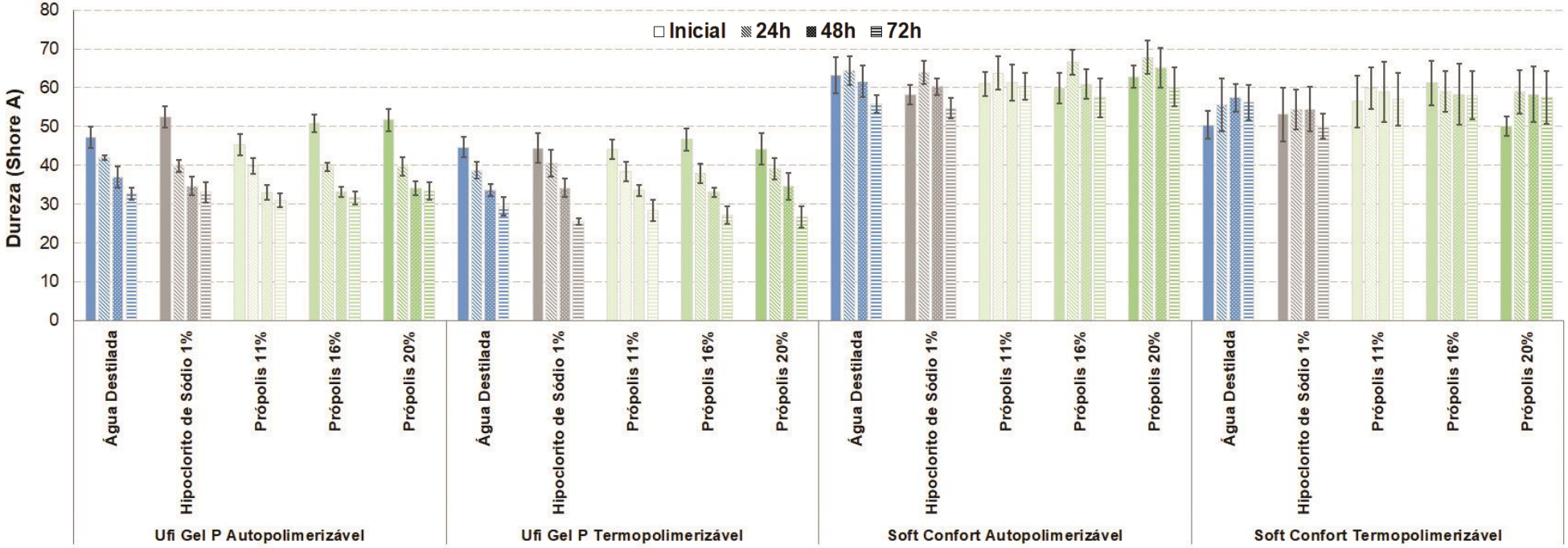

Figura 3. Valores médios de dureza (Shore A) dos materiais reembasadores resilientes para cada tratamento e período de desinfecção.

FONTE: Arquivo Pessoal.

5 DISCUSSÃO

Em pacientes portadores de próteses totais e obturadoras, o tratamento com antifúngicos pode eliminar a contaminação por *C. albicans*, aliviando a inflamação causada pela estomatite. Contudo, se estes dispositivos intra-orais não forem regularmente descontaminados, o processo infeccioso poderá recidivar quando a terapia antifúngica é descontinuada (Gendreau e Loewy, 2011). A atividade antimicrobiana do extrato de própolis na microbiota oral, especificamente frente à *C. albicans*, já foi demonstrada em estudos prévios (Pina et al., 2017 ; Santos et al., 2005). Pina et al. (2017) comprovaram a eficácia de um gel contendo extrato de própolis brasileira padronizado (EPP-AF®) a 2% (20 mg / g) para erradicar espécies de *Candida spp*. oral. Adicionalmente, demonstraram que 95% dos pacientes que testaram o gel reportaram sentir gosto agradável e apenas um paciente reportou sentir reação de hipersensibilidade durante a aplicação. Em outro estudo, Santos et al. (2005) constataram que o gel comercial de extrato etanólico de própolis brasileiro inibiu a candidíase oral em pacientes com candidíase associada à estomatite protética, mostrando uma regressão da lesão similar aos pacientes que foram tratados com nistatina. Apesar disso, 1,2 a 6,6% dos pacientes que são testados para dermatite são sensíveis à própolis, que atua como um alérgeno, induzindo uma reação de hipersensibilidade em certos indivíduos (WALGRAVE *et al*., 2005).

Por outro lado, os resultados encontrados nesta pesquisa são corroborados por estudos que avaliaram o extrato de própolis como agente desinfetante. Heidrich *et al.* (2017) confirmaram a eficácia do extrato glicólico de própolis 12% frente à cepa de *C. albicans* que cresceu sobre superfície de resina acrílica, com resultado equivalente à desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%. Enquanto outros pesquisadores como Yildirim-Bicer *et al.* (2014) e Karakis *et al.* (2016) verificaram que a desinfecção de superfícies de resina acrílica com produtos à base de própolis (enxaguante bucal contendo própolis e extrato etanólico de própolis a 10%, respectivamente) foi estatisticamente diferente do grupo controle (sem desinfecção), contudo, não foi tão efetiva como a desinfecção com produtos convencionalmente utilizados.

Adicionamente, há ainda estudos que comprovam a eficácia do própolis na inibição de crescimento de *C. albicans.* Sawaya *et al.,* (2002) fizeram um estudo comparativo de diferentes métodos utilizados para analisar a atividade de diversas composições de extrato de própolis contra espécies de Candida, e afirmaram que para *C. albicans* a atividade de todos os extratos de própolis testados por diluição seriada em tubos foi

equivalente à da solução controle (álcool 70%). As substâncias químicas encontradas na própolis não obedecem um mesmo padrão, o que faz dele um potencial agente antimicrobiano, uma vez que essa variação do padrão poderia inibir o desenvolvimento de resistência das bactérias ao agente antibacteriano (BARLAK *et al.,* 2011). Dos compostos presentes no própolis, os fenóis foram responsáveis pelas atividades antimicrobianas presentes na própolis extraída da região sudeste do Brasil (PAULA *et al.*, 2006). Ao que parece os benefícios da própolis estão relacionados aos flavonóides, estibenos, fenóis e ésteres presentes na sua composição elementar (SALATINO *et al.*, 2005).

O própolis deve ser purificado por extração com solventes para remover o material inerte e preservar a fração polifenólica, para então poder ser utilizado. Estes compostos (flavonóides e ácidos fenólicos) são considerados antioxidantes naturais e contribuem para os efeitos terapêuticos do própolis. Em estudo recente, Galeotti *et al.* (2018) demonstraram que os extratos glicólico e hidroalcoólico possuíam maior porcentagem de polifenóis quando comparados à outros extratos. Sendo assim, além das propriedades anti-sépticas, antimicóticas, anti-inflamatórias e antioxidantes, o extrato glicólico de própolis, que é a base de propilenoglicol, surge como uma alternativa a pacientes sensíveis ao etanol, por não possuí-lo em sua formulação.

A composição do própolis varia, contudo, geralmente apresenta 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias diversas (BURDOCK, 1998) . Esta combinação de resina com a cera faz com que a substância seja essencialmente viscosa, se acumulando facialmente sobre as superfícies. Da Silva *et al.* (2008), em um estudo sobre os efeitos de agentes antifúngicos em resinas acrílicas, afirmam que o acúmulo de própolis na superfície da resina dificulta a absorção de água na matriz polimérica do material, impedindo que sua dureza diminua ao longo do tempo. Além disso, sugerem que essa camada de própolis depositada, apesar de aumentar a rugosidade de superfície, pode atuar como uma barreira contra a adesão de *C. albicans*, podendo prolongar seus benefícios sobre a mucosa inflamada, considerando as propriedades antiinflamatórias deste produto natural.

Em contrapartida, outras soluções desinfetantes, por serem constituídas basicamente de água, podem diminuir a dureza dos materiais ao longo do tempo. Pinto *et al.* (2009) estudaram o efeito de ciclos repetidos de desinfecção química sobre a rugosidade e dureza de resinas acrílicas para reembasamento. Todos os desinfetantes estudados (três concentrações diferentes de hipoclorito de sódio, 2% glutaraldeído e 4% gluconato de clorexidina) provocaram uma diminuição estatisticamente significante da

dureza, assim como aconteceu com os discos desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% no presente estudo. Os resultados de ambos os estudos condizem com a hipótese de que as soluções desinfetantes à base de água são absorvidas pela resina e atuam como plastificantes. A água se difunde através do material, que absorve a umidade até que fique saturado e com uma superfície mais macia, diminuindo os valores de dureza.

Quando em contato com os fluidos orais, os plastificantes (e outros produtos solúveis) por não se ligarem à massa de resina, podem ser eliminados por lixiviação, o que torna os reembasamentos resilientes cada vez mais rígidos. O equilíbrio entre esse processo e a sorção de água e saliva influencia na conformação e na estabilidade dimensional da prótese. (KAWALA *et al.*, 2018). Por sua vez, os materiais constituídos de elastômeros de silicone não dependem de plastificantes lixiviáveis, já que a resiliência é uma propriedade intrínseca desse tipo de polímero, retendo suas propriedades elásticas por períodos prolongados . Os silicones quimicamente ativados vêm como um sistema de duas partes que polimerizam através de reações de condensação. Já os termicamente ativados apresentam-se na forma de um sistema único em pasta ou gel. Podem ser aplicados às bases de próteses previamente polimerizadas ou serem polimerizados juntamente com a confecção da prótese com resina recém-manipulada (ANUSAVICE *et al.*, 2013).

Apesar das inúmeras vantagens dos reembasadores resilientes, todos apresentam algumas desvantagens. Os reembasadores de silicone, por exemplo, apresentam adesão pobre à base acrílica da prótese. Além disso apresentam poros em sua superfície, permitindo absorção de água e difusão de nutrientes, o que pode tornar a prótese facilmente colonizada por microrganismos (DE FOGGI *et al.*, 2018). Contudo, um dos maiores desafios relacionados aos reembasadores resilientes é que estes materiais não podem ser higienizados efetivamente: a limpeza mecânica e produtos de desinfecção destinados a esse fim podem causar alterações de cor e danos significativos aos materiais de reembasamento (ANUSAVICE *et al.*, 2013). Por esses motivos têm-se pesquisado produtos que cumpram com eficiência a desinfecção, mas que alterem minimamente as propriedades do material da prótese e que sejam inertes ao portador e acessíveis à população.

Como limitações deste estudo, pode-se ressaltar a possibilidade da solução de própolis glicólica ocasionar alguma alteração nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais reembasadores resilientes, como alteração de cor, devido à presença de clorofila ; alteração da estabilidade dimensional e rugosidade superficial, principalmente

pelo depósito resinoso residual inerente à natureza viscosa do própolis.

6 CONCLUSÕES

- As soluções de extrato glicólico de própolis verde brasileiro apresentaram amplo espectro na remoção do biofilme de *Candida albicans* na superfície de materiais reembasadores resilientes, igualando-se ao hipoclorito de sódio 1%.

- Pode-se verificar diminuição dos valores de dureza para todos os materiais avaliados ao final do período de 72 horas, independentemente da solução desinfetante utilizada.

- A dureza dos materiais tratados com hipoclorito de sódio 1% apresentou-se menor no período de 72h comparativamente as soluções de própolis e água destilada.

REFERÊNCIAS

1. BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Journal of ethnopharmacology, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

2. BARLAK, Yaşam et al. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. Proteome science, v. 9, n. 1, p. 74, 2011.

3. BEUMER, John; MARUNICK, Mark T.; ESPOSITO, Salvatore J. Maxillofacial rehabilitation: prosthodontic and surgical management of cancer-related, acquired, and congenital defects of the head and neck. Quintessence Pub., 3rd edition, 2011.

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

5. DE PAULA, Alfredo Mauricio Batista et al. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. Pharmacology online, v. 3, p. 467-473, 2006.

6. DE REZENDE PINTO, L. et al. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard reline acrylic resins. Gerodontology, v. 27, n. 2, p. 147-153, 2009.

7. DE, CC Foggi et al. Effect of surface characteristics of soft liners and tissue conditioners and saliva on the adhesion and biofilm formation. American journal of dentistry, v. 31, n. 1, p. 45-52, 2018.

8. GALEOTTI, Fabio et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. Foods, v. 7, n. 3, p. 41, 2018.

9. GENDREAU, Linda; LOEWY, Zvi G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. Journal of Prosthodontics: Implant, Esthetic and Reconstructive Dentistry, v. 20, n. 4, p. 251-260, 2011.

10. GETTLEMAN, L. Resinas e polímeros protéticos. In: ANUSAVICE, K. J.; SHEN, C.; RAWLS, H.R. Phillips materiais dentários. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2013. Cap 19, p.474-499

11. GOIATO, Marcelo Coelho et al. Prosthetic treatments for patients with oronasal communication. Journal of Craniofacial Surgery, v. 22, n. 4, p. 1445-1447, 2011.

12. GONZÁLEZ,G. et al. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. International Journal of Food Microbiology, n. 105, p. 1– 9, 2005.

13. HEIDRICH, Daiane et al. Rosemary, Castor Oils, and Propolis Extract: Activity Against Candida Albicans and Alterations on Properties of Dental Acrylic Resins. Journal of Prosthodontics, v. 0, n. 0, p. 1-6, 2018.

14. JOSEPH, Shawn T. et al. Challenges in the reconstruction of bilateral maxillectomy

defects. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 73, n. 2, p. 349-356, 2015.

15. KARAKIS, Duygu et al. Effectiveness of disinfectants on the adherence of Candida albicans to denture base resins with different surface textures. Journal of oral science, v. 58, n. 3, p. 431-437, 2016.

16. KAWALA, M. et al. Selected applications for current polymers in prosthetic dentistry-state of the art. Current medicinal chemistry, 2018.

17. KUCHARÍKOVÁ, Soňa et al. Detailed comparison of Candida albicans and Candida glabrata biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. Journal of medical microbiology, v. 60, n. 9, p. 1261-1269, 2011.

18. LI, L.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Oral epithelium-Candida glabrata interactions in vitro. Oral microbiology and immunology, v. 22, n. 3, p. 182-187, 2007.

19. MANCUSO, Daniela Nardi et al. Effect of thermocycling on hardness, absorption, solubility and colour change of soft liners. Gerodontology, v. 29, n. 2, p. e215-e219, 2012.

20. MANCUSO, Daniela Nardi et al. Evaluation of hardness and colour change of soft liners after accelerated ageing. Primary Dental Care, v. 16, n. 3, p. 127-130, 2009.

21. MATTOS, B. S. C. et al. Candida albicans in patients with oronasal communication and obturator prostheses. Brazilian dental journal, v. 20, n. 4, p. 336-340, 2009.

22. MONTEIRO, D.R. et al. Silver colloidal nanoparticle stability: influence on Candida biofilms formed on denture acrylic. Medical Mycology, v. 52, n. 6, p. 627-35, 2014.

23. NAKAHARA, Tatsuro et al. Influence of a new denture cleaning technique based on photolysis of H2O2 the mechanical properties and color change of acrylic denture base resin. Dental materials journal, v. 32, n. 4, p. 529-536, 2013.

24. NOORI, A. L. et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans isolates in single and polymicrobial cultures. International journal of medical sciences, v. 9, n. 9, p. 793, 2012.

25. PARANHOS, Helena de Freitas Oliveira et al. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. Brazilian dental journal, v. 24, n. 2, p. 152-156, 2013.

26. PINA, Gisela de et al. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, 2017.

27. PINTO, Luciana de Rezende et al. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard reline acrylic resins. Gerodontology, v. 27, n. 2, p. 147-153, 2010.

28. PROCÓPIO, A. L. F. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of denture base acrylic resin impregnated with cleaning agents after long-term immersion. Toxicology in Vitro, v. 25, n. 52, p. 8-13, 2018.

29. SALATINO, Antonio et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

30. SANTOS, V. R. et al. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, v. 19, n. 7, p. 652-654, 2005.

31. SAWAYA, A. C. H. F. et al. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of Candida. Letters in applied microbiology, v. 35, n. 3, p. 203-207, 2002.

32. SFORCIN, José M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. Phytotherapy research, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

33. SILVA, Wander José da et al. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly (methyl methacrylate) resin surface. Brazilian dental journal, v. 19, n. 3, p. 190-196, 2008.

34. SUSEWIND, Sabine; LANG, Reinhold; HAHNEL, Sebastian. Biofilm formation and C andida albicans morphology on the surface of denture base materials. Mycoses, v. 58, n. 12, p. 719-727, 2015.

35. WALGRAVE, Susan E.; WARSHAW, Erin M.; GLESNE, Lynn A. Allergic Contact Dermatitis from Propolis. Dermatitis, v. 16, n. 4 , p. 209–215, 2005.

36. YILDIRIM-BICER, A. Z. et al. In vitro antifungal evaluation of seven different disinfectants on acrylic resins. BioMed research international, v. 2014, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Materiais e equipamentos utilizados no estudo

Figura 4. Material para reembasamento de prótese dentária à base de resina (DENCRIL COMÉRCIO DE PLÁSTICOS LTDA; SP, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.

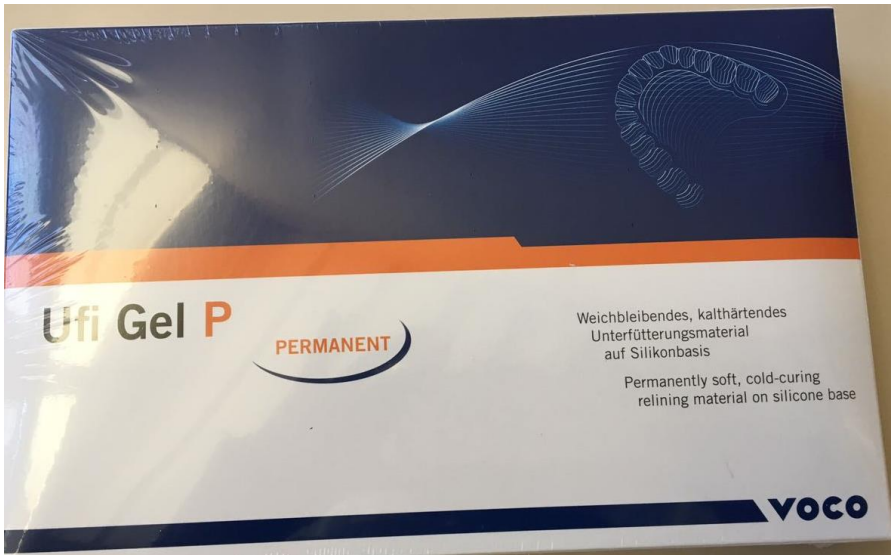

Figura 5. Material para reembasamento de prótese dentaria à base de silicone (VOCO GmbH; Cuxhaven, Alemanha).

FONTE: Arquivo Pessoal.

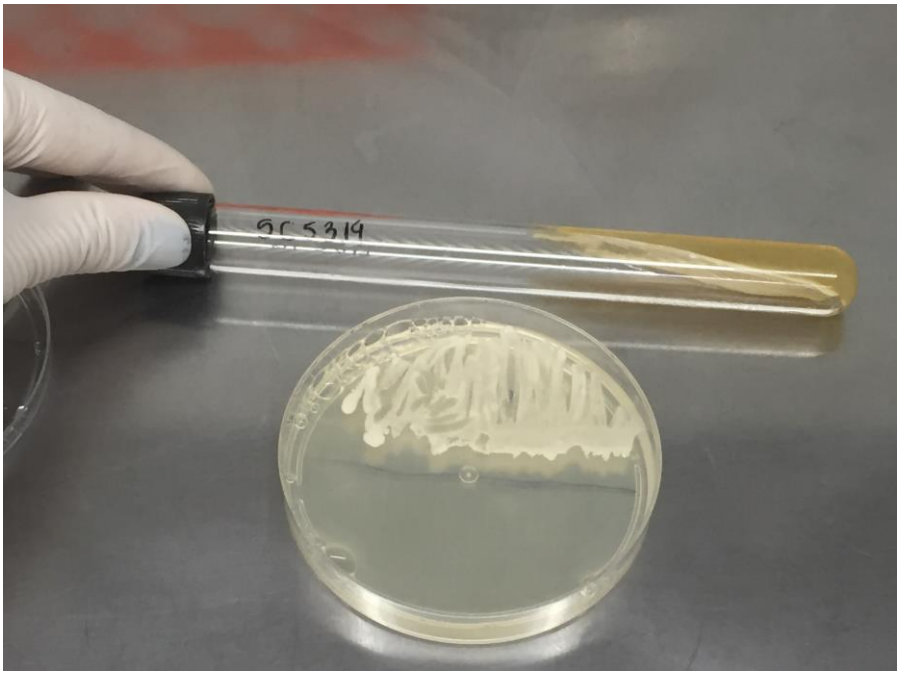

Figura 6. Cepa de *C. albicans* (SC 5314).

FONTE: Arquivo Pessoal.

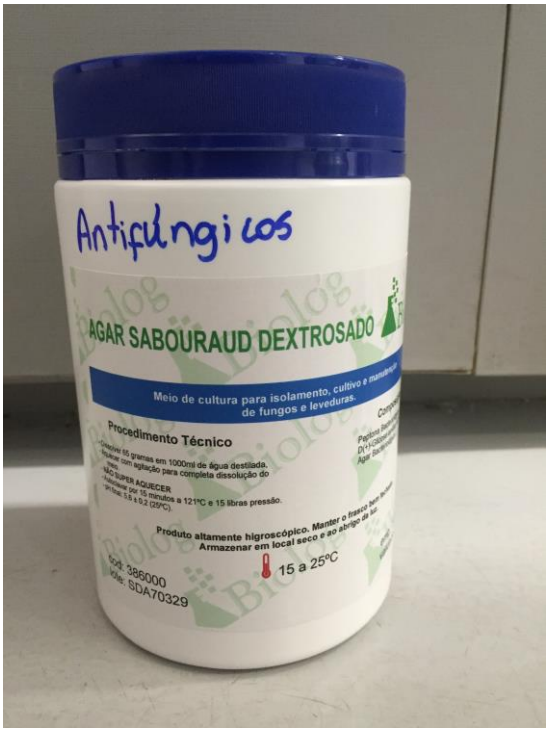

Figura 7. Meio de cultura Agar Sabouraud Dextrosado.

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 8. Tratamentos de desinfecção utilizados no estudo, da esquerda para a direita: solução glicólica de extrato de própolis verde a 11% (Bee Propolis, Brasil); solução glicólica de extrato de própolis verde a 16% (Bee Propolis, Brasil); solução glicólica de extrato de própolis verde a 20% (Bee Propolis, Brasil); Hipoclorito de sódio a 1% (Lenzafarm, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 9. Alça em T para esfregaço (Inlab, Brasil) celular.

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 10. Panela Polimerizadora de resina acrílica (Metal Vander, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 11. Espectrofotômetro (SP22, Biospectro ; SP, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.

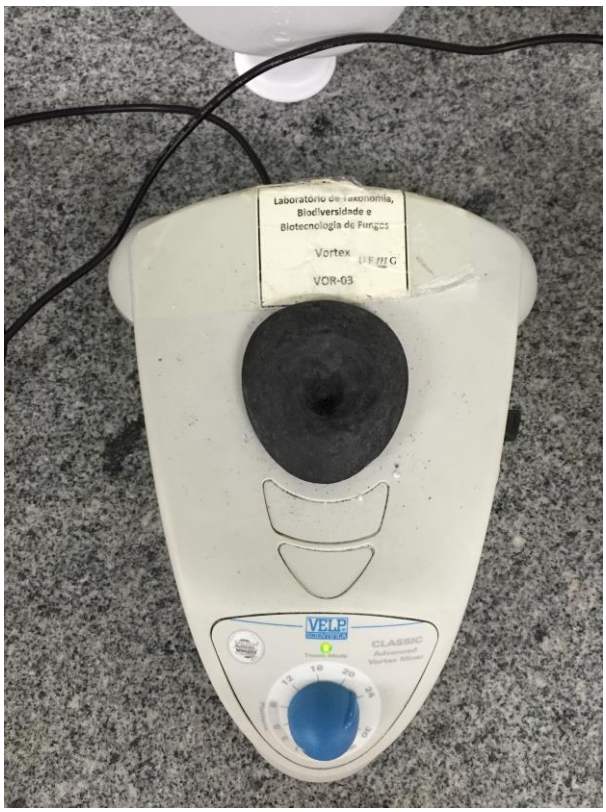

Figura 12. Vortex Mixer (CLASSIC, VELP Scientifica; Itália).

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 13. Durômetro Shore A Hardmatic Digital (HH-336, Mitutoyo, Japão).

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 14. Câmara Incubadora com Agitação Orbital (TE-4200, Tecnal ; SP, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.

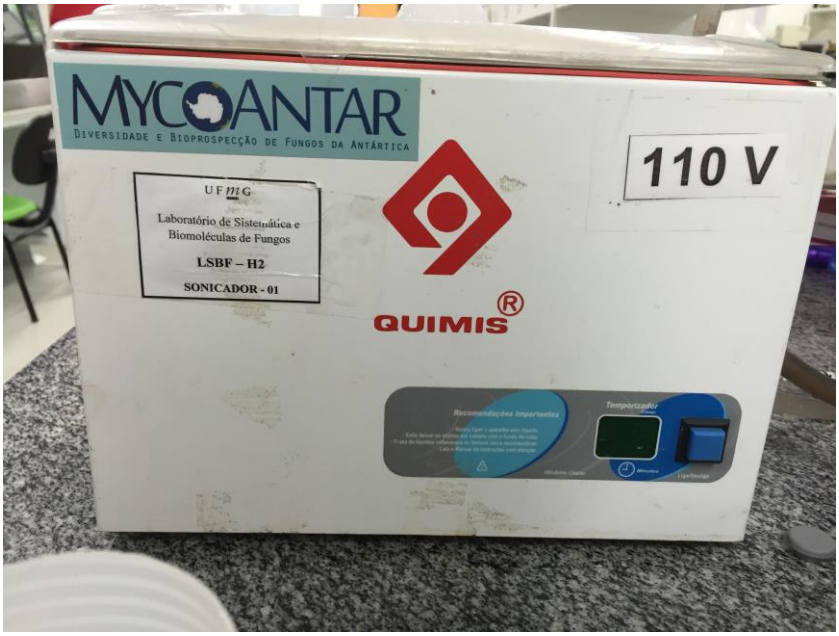

Figura 15. Sonicador (Q3350, Quimis, SP, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.

APÊNDICE B – Confecção dos discos de reembasadores resilientes

Figura 16. Vista superior da matriz metálica.

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 17. Discos embaladas e estéreis por óxido de etileno para os testes microbiológicos.

FONTE: Arquivo Pessoal.

APÊNDICE C – Cultura, Desenvolvimento do Biofilme e Contagem das Unidades Formadoras de Colônias

Figura 18. Adição de saliva aos poços para formação de película adquirida sobre os discos.

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 19. Solução salina estéril e inóculo da levedura (aprox. 1,1 x 10^7 UFC/mL).

FONTE: Arquivo Pessoal.

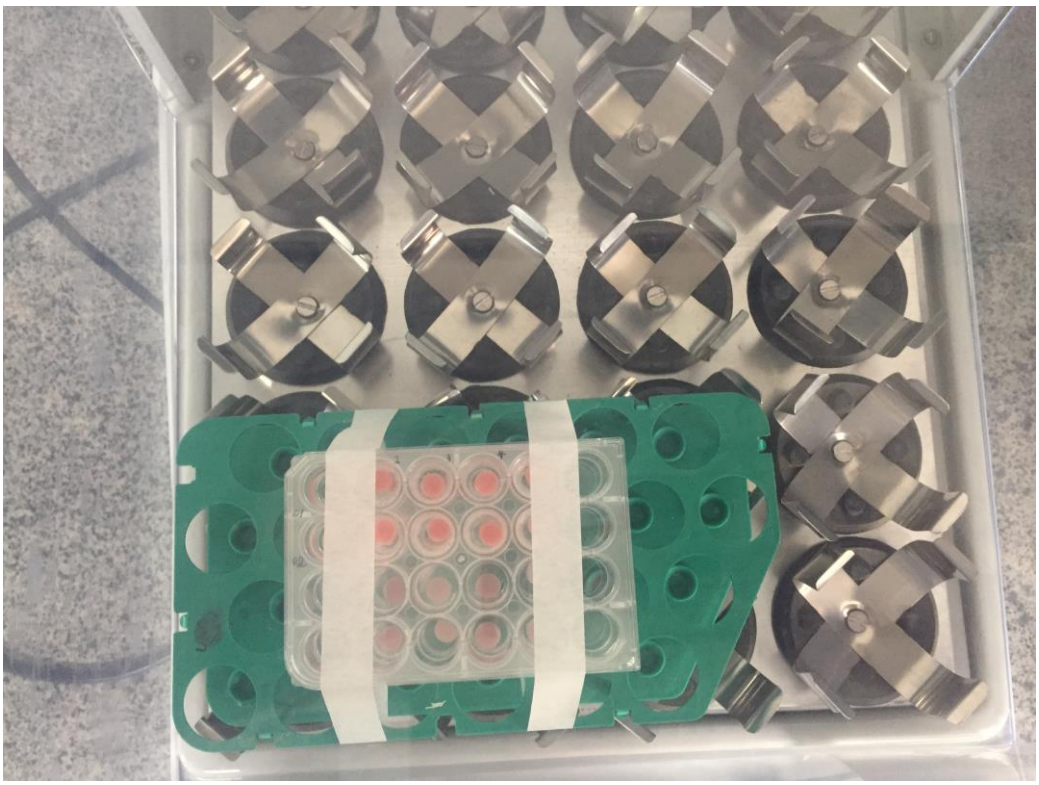

Figura 20. Discos imersos em inóculo de *C. albicans* mantidos sob agitação para adesão da amostra fúngica à película adquirida na superfície dos discos.

FONTE: Arquivo Pessoal.

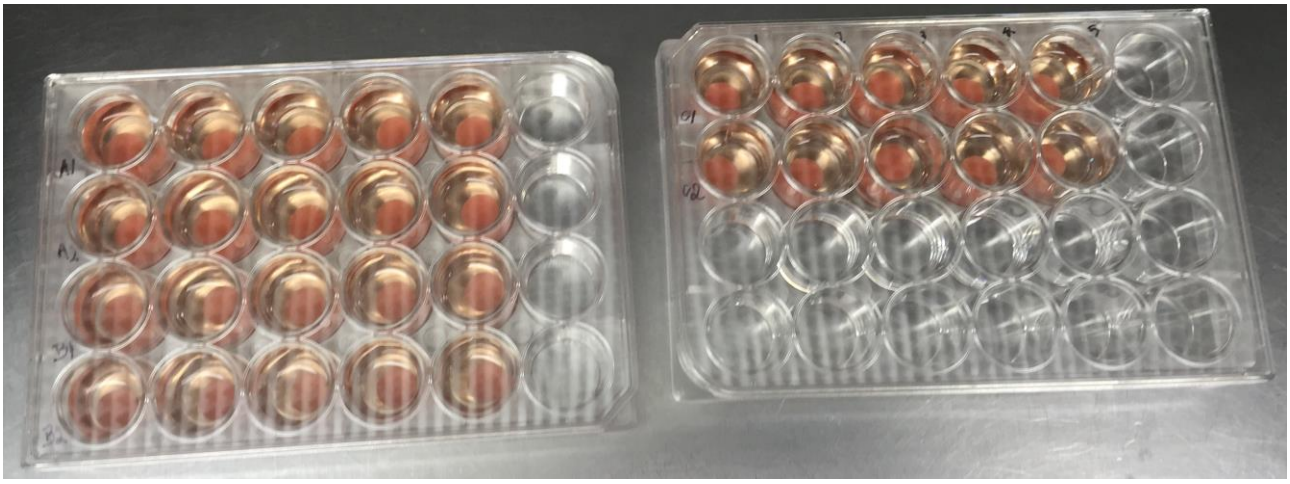

Figura 21. Discos imersos em meio RPMI para crescimento do biofilme por 48h sob agitação em estufa.

FONTE: Arquivo Pessoal.

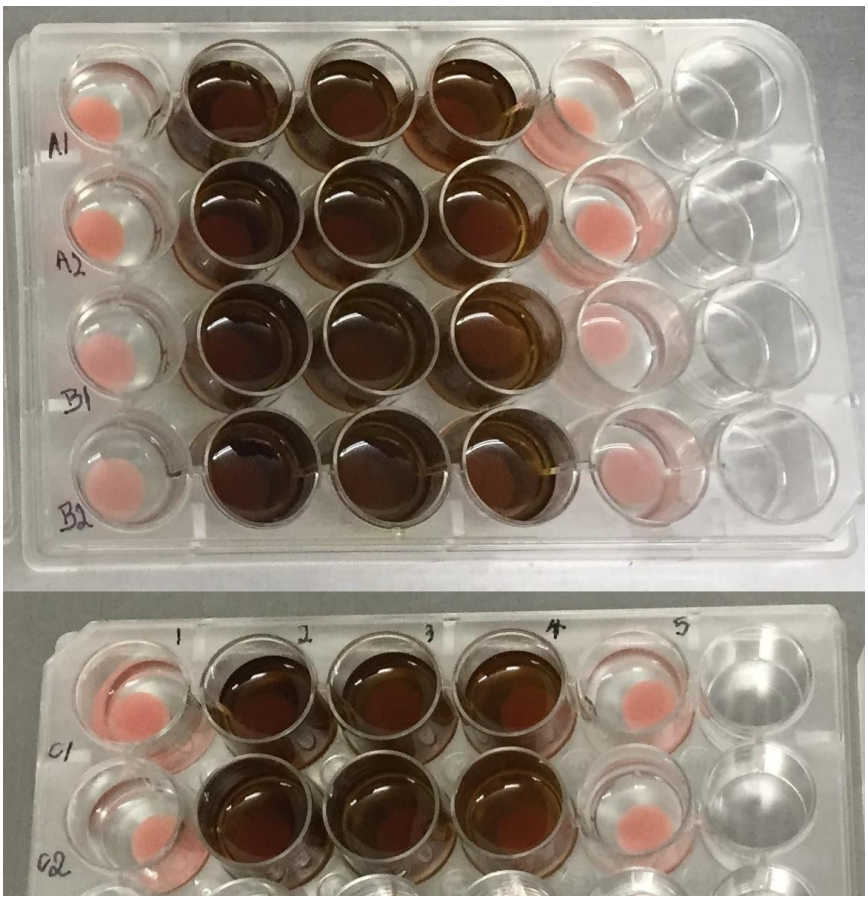

Figura 22. Desinfecção dos discos após desenvolvimento do biofilme.

FONTE: Arquivo Pessoal.

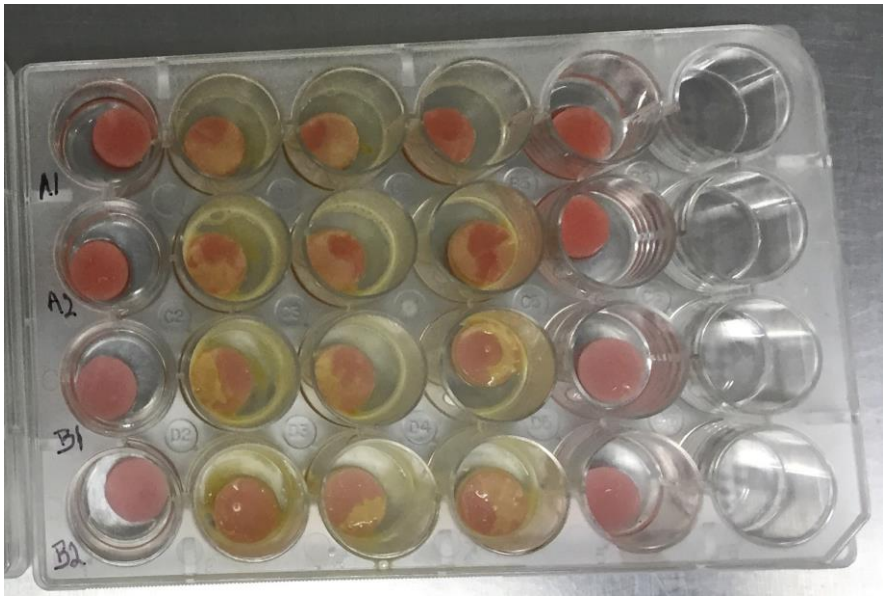

Figura 23. Aspecto dos discos após lavagem com salina estéril.

FONTE: Arquivo Pessoal.

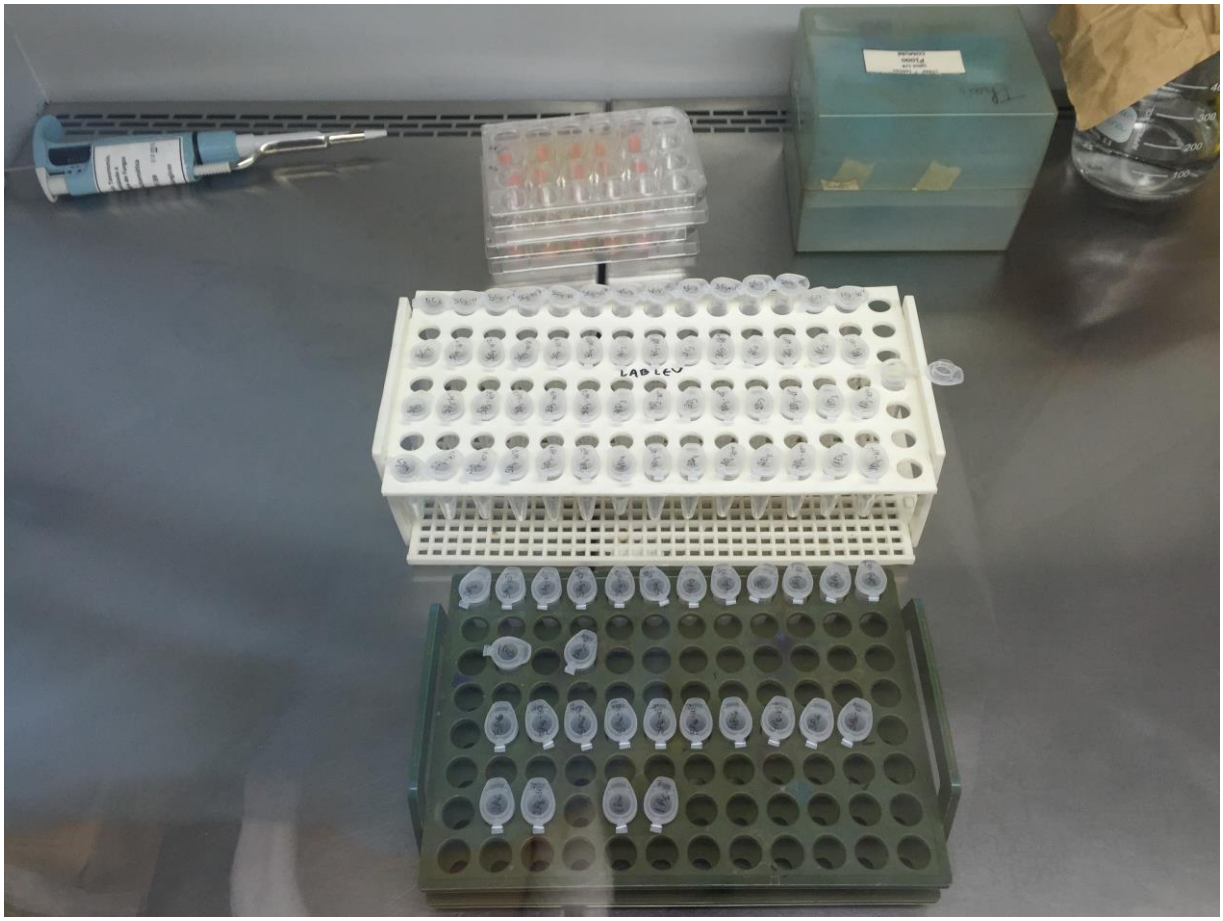

Figura 24 - Preparação para de diluição seriada em salina: Cada ependorf conteve 900 µL de salina + 100 µL da solução de NaCl com biofilme desagregado transferida da placa de 24 poços após sonicamento.

FONTE: Arquivo Pessoal.

Figura 25 - Procedimento de espalhamento da diluição seriada na placa pertri contendo Agar Sabouraud**:** Infiltração de 20 µL de cada diluição na placa petri e espalhamento do conteúdo com alça em T.

FONTE: Arquivo Pessoal.

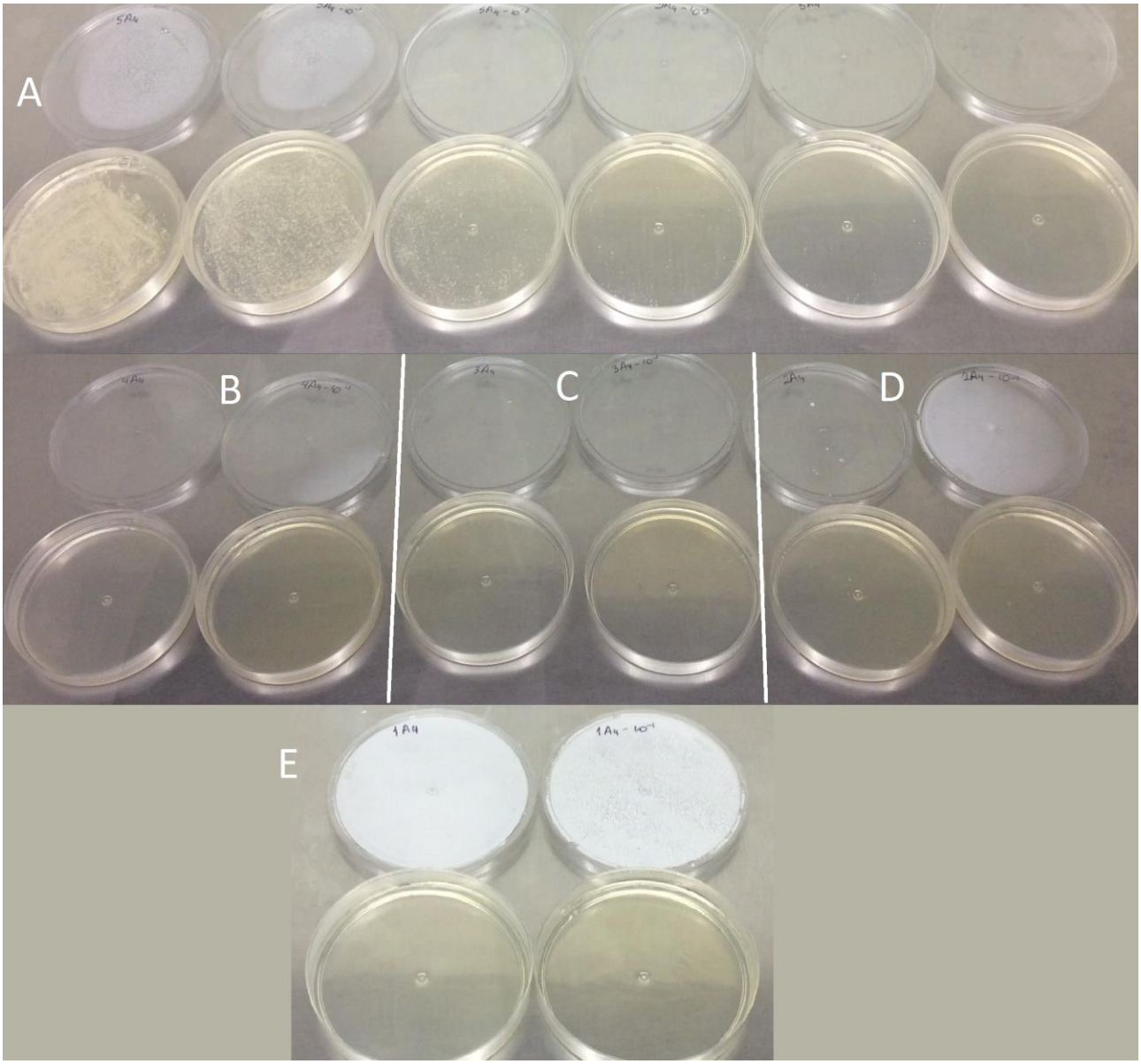

Figura 26 - Placas Petri após incubação a 37°C por 24 horas pronta para contagem do número de colônias formadas por mililitro : (A) Placas Petri referentes ao controle com água destilada, em 5 diluições (B) Placas Petri referentes à desinfecção com Própolis 11% (C) Placas Petri referentes à desinfecção com Própolis 16% (D) Placas Petri referentes à desinfecção com Própolis 20% (E) Placas Petri referentes à desinfecção com Hipoclorito de sódio 1%.

FONTE: Arquivo Pessoal.

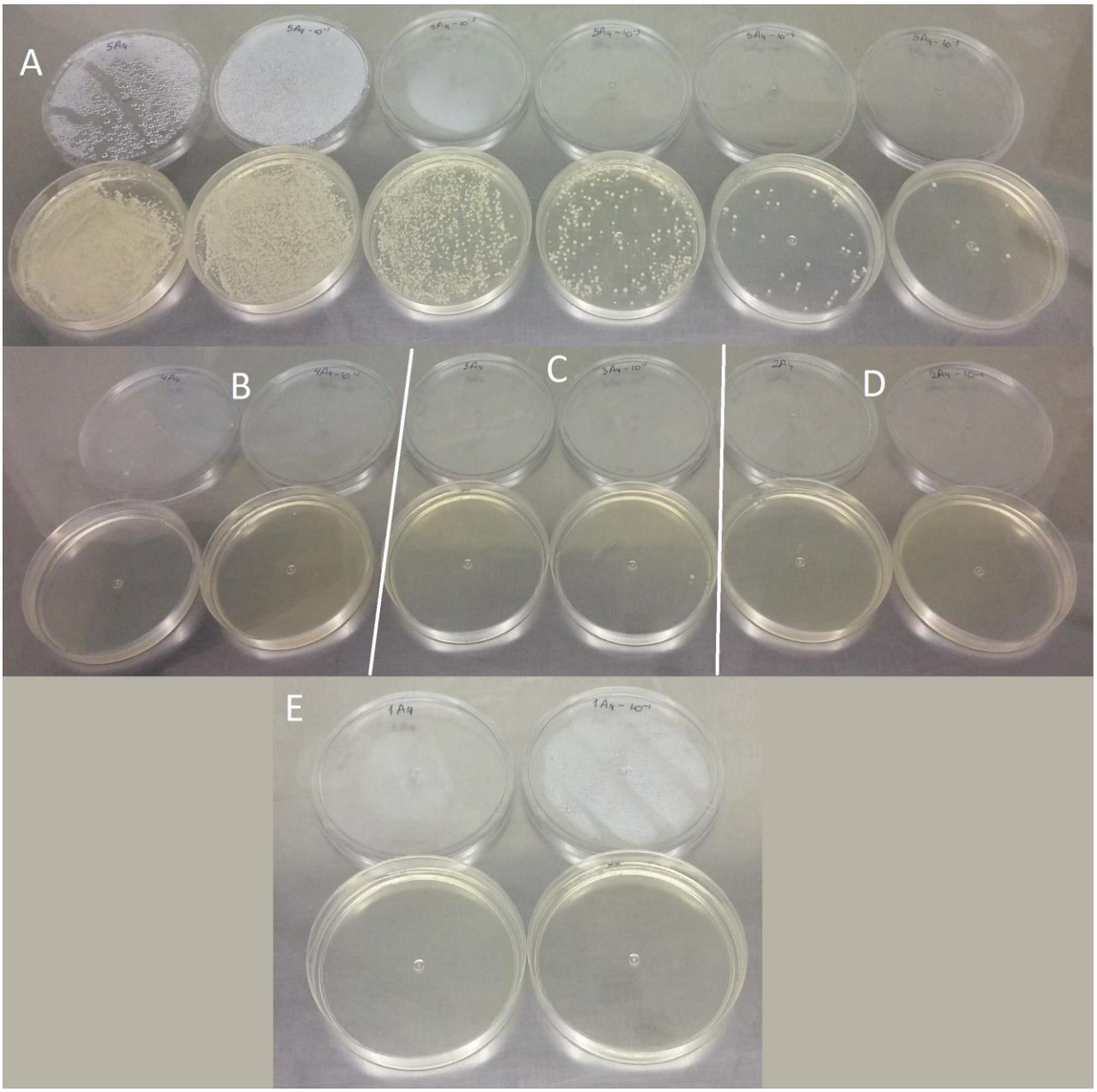

Figura 27 - Placas Petri após incubação a 37°C por 48 horas pronta para contagem do número de colônias formadas por mililitro : (A) Placas Petri referentes ao controle com água destilada, em 5 diluições (B) Placas Petri referentes à desinfecção com Própolis 11% (C) Placas Petri referentes à desinfecção com Própolis 16% (D) Placas Petri referentes à desinfecção com Própolis 20% (E) Placas Petri referentes à desinfecção com Hipoclorito de sódio 1%.

FONTE: Arquivo Pessoal.