

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Isabela Barbosa Simões Lopes

Efeito de soluções de extrato de própolis verde Brasileira na remoção do biofilme de
Staphylococcus aureus em superfície de elastômero de silicone facial

Belo Horizonte – MG

2017

Isabela Barbosa Simões Lopes

Efeito de soluções de extrato de própolis verde Brasileira na remoção do biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfície de elastômero de silicone facial

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

2017

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho representa a finalização de uma etapa muito importante da minha vida profissional e não teria sido concluída se não houvesse o apoio de todos que me acompanharam em minha caminhada até aqui. Agradeço primeiro a Deus por guiar os meus passos durante essa trajetória e por colocar pessoas especiais em meu caminho; aos meus pais por todo apoio e amor incondicionais; aos meus irmãos que sempre me inspiram a ser uma pessoa melhor; às minhas amigas da faculdade que fizeram a graduação se tornar mais leve e alegre; aos mestres por todo ensinamento e por serem inspiração, em especial Profa. Amália Moreno, Prof. Ricardo Alves de Mesquita e Prof. Vagner Santos da FO-UFMG, que sempre compartilharam seus conhecimentos e me apoiaram durante a graduação, possibilitando a conclusão deste trabalho. À Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, pela esterilização dos discos de silicone utilizados neste estudo. À empresa Pharmanéctar na pessoa do Diretor Sr. José Alexandre Silva de Abreu e Sra. Sheila R. Lemos Abreu, bem como demais funcionários colaboradores sempre com prontidão e disponibilidade nos produtos e preparo das soluções de extrato de própolis verde avaliadas neste estudo. Além disso em particular agradecimentos ao Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FO-UFMG na pessoa do Prof. Luiz de Macêdo Farias, Profa. Paula Prazeres Magalhães, Profa. Simone Gonçalves dos Santos e Mestranda Débora Calefi, os quais permitiram a realização do teste microbiológico com atenção e seriedade.

Muito Obrigada!

RESUMO

As próteses faciais visam reconstruir artificialmente as perdas de substâncias das diversas regiões da face por meio do silicone protético facial. No entanto, este material pode se tornar excelente meio para microrganismos oportunistas. O objetivo deste estudo foi testar a eficácia de soluções a base de extrato de própolis verde comparativamente a soluções convencionais na remoção do biofilme em discos de elastômero de silicone facial. Foram confeccionados discos de silicone de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura e submetidos a 48 horas de crescimento e desenvolvimento do biofilme de *Staphylococcus aureus*. Os discos de silicone foram tratados com as soluções propostas no estudo (solução aquosa de própolis verde-SAPV e/ou etanólica de própolis verde-SEPV, ambas na concentração de 10%; agente antimicrobiano DaroBrand-ATDB, específico para prótese facial; gluconato de clorexidina a 4%-CHX4 como controle positivo; e água destilada-CTLA como controle negativo). Os tratamentos de desinfecção para todas as soluções foram realizados em 3 diferentes períodos de tempo (10 min, 15 min ou 30 min). A análise microbiológica foi realizada em triplicata em dois experimentos independentes. A contagem de colônias foi verificada por análise do número de UFC/mL. Análise de Variância (ANOVA) dois-fatores foi aplicada aos dados, seguida por teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Verificou-se para os tratamentos de CHX4 e SEPV ausência de UFC. Ambos os tratamentos: SAPV e ATDB apresentaram menores valores de UFC em relação ao controle. Concluiu-se amplo espectro antibiofilme para SEPV, e efeito antimicrobiano eficaz aos demais tratamentos avaliados.

Palavras-chave: Prótese maxilofacial. Biofilme. Desinfecção. Própolis. Clorexidina.

ABSTRACT

Facial prostheses aim to artificially reconstruct the losses of substances from the various regions of the face by means of facial prosthetic silicone. However, this material can become an excellent medium for opportunistic microorganisms. The purpose of this study was to test the efficacy of solutions based on green propolis extract compared to conventional solutions in the removal of biofilm in facial silicone elastomer disks. Silicon disks with a 10-mm diameter and 2-mm thickness were made and subjected to 48 hours of growth and development of the *Staphylococcus aureus* biofilm. The silica disks were treated with the solutions proposed in the (an aqueous solution of green propolis (ASGP) and/or ethanol solution of green propolis (ESGP), both at 10% concentration; an anti-microbial agent DaroBrand (ATDB), specific for facial prosthesis; 4% chlorhexidine (CHX4) as a positive control; and distilled water (CTLA) as a negative control). Disinfection treatments for all solutions were performed in three different time periods (10 min, 15 min, or 30 min). Microbiological analysis was performed in triplicate in two independent experiments. Colony count was verified by analysis of the CFU/mL number. Two-factor Analysis of Variance (ANOVA) was applied to the data, followed by the Tukey test ($\alpha = 0.05$). CHX4 and ASGP treatments were verified without CFU. Both treatments – ASGP and ATDB – presented lower CFU values in relation to the control. A wide spectrum of antibiofilm for ASGP was completed and the effective antimicrobial effect of the other treatments was evaluated.

Keywords: Maxillofacial prosthesis. Biofilm. Disinfection. Própolis. Chlorhexidine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

et al.	= e outros
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/in ²	= 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
CHX4	= gluconato de clorexidina a 4%
SAPV	= solução etanólica de própolis verde a 10%
SEPV	= solução aquosa de própolis verde a 10%
ATDB	= agente antimicrobiano específico-Daro Brand
PVB	= Própolis verde brasileira
%	= porcentagem
°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
ANOVA	= análise de variância
ln	= logarítmo natural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4 RESULTADOS.....	16
5 DISCUSSÃO.....	19
6 CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
APÊNDICES.....	28

1 INTRODUÇÃO

A prótese facial está entre as várias modalidades da prótese maxilofacial, sendo responsável por reconstruir artificialmente ou aloplasticamente as perdas de substância da região de cabeça e pescoço¹⁻³. Esta área da Odontologia restaura a anatomia facial perdida ou comprometida por câncer, traumas ou defeitos congênitos, por meio de substitutos artificiais, devolvendo a estética e a identidade facial ao paciente, além de contribuir para elevar a autoestima dos pacientes mutilados, reintegrando-os, assim, ao convívio social⁴⁻⁵.

Atualmente, o elastômero de silicone facial é considerado o material que mais se aproxima do ideal para a confecção de próteses faciais, por apresentar facilidade de manipulação, propriedades físicas e mecânicas viáveis, biocompatibilidade, custo relativamente acessível, além de permitir pigmentação e caracterização, e ter textura semelhante à da epiderme³. Essas características possibilitam que o profissional alcance um padrão estético agradável para a prótese, a ponto de ser mimetizada aos tecidos circunjacentes, atingindo aparência natural^{3,5}.

No entanto, é conhecido que esses materiais podem apresentar problemas associados a sua utilização, tais como a absorção de água, deformação permanente, deterioração superficial e alteração de cor a longo prazo⁶⁻⁸. As próteses faciais, geralmente quando instaladas, entram imediatamente em contato com as margens do tecido remanescente ao defeito facial ou loja cirúrgica, ambiente que em sua grande maioria, estão contaminados com os fluidos humanos, como sangue, suor e secreção local^{9, 10}. Com isso, a superfície da prótese facial pode tornar-se favorável à colonização por uma determinada microbiota e consequente desenvolvimento de biofilme.

O biofilme é definido como uma comunidade de micro-organismos sésseis caracterizada por células que se aderem a um substrato biótico ou abiótico e umas às outras, embebidas em uma matriz ou polímero extracelular, e constitui um modo de proteção dos micro-organismos permitindo sua sobrevivência em ambientes hostis^{11,12}. A maioria dos micro-organismos infecciosos e colonizadores de superfícies de biomateriais são encontrados ligados à superfície de um biofilme formado¹²⁻¹⁴. Esses micro-organismos estão diretamente relacionados a casos de dermatite bacteriana, endoftalmite, entre outros, e também têm a capacidade de aderir em uma grande variedade de superfícies¹⁴. Entre os micro-organismos

colonizadores de próteses maxilofaciais e tecido remanescente encontram-se os estafilococos coagulase-positivos, cujo principal representante é o *Staphylococcus aureus*¹⁴, e os estafilococos coagulase-negativos, cuja espécie mais frequente é o *Staphylococcus epidermidis*¹². O *S. aureus* vive principalmente nas superfícies das mucosas e tem sido considerado um dos mais versáteis e perigosos patógenos humanos devido aos seus fatores de virulências com alto grau de patogenicidade¹⁴.

Diante disso, é importante ressaltar a necessidade do controle da formação de biofilme para manter a saúde do tecido remanescente dos portadores de prótese facial. Os métodos de tratamentos de desinfecção dos materiais utilizados em prótese facial ainda são escassos na literatura^{6-8,10}. Dentre os métodos de limpeza citados para próteses maxilofaciais está a utilização de soluções químicas ou fitoterápicas, associadas ou não ao uso de técnicas alternativas como radiação por energia de micro-ondas, entre outras^{6-8, 15,16}.

O método da fricção ou escovação de próteses faciais ainda não é totalmente aconselhável, pois esta lavagem repetida pode dissolver e/ou remover a pigmentação estética extrínseca de sua porção estética anterior, e mesmo contribuir na deterioração do material a longo prazo^{6,10}. A técnica da imersão química é essencialmente o método de escolha para a desinfecção de próteses faciais. O uso da solução de gluconato de clorexidina, por exemplo, embora apresente limitações as propriedades do material⁶⁻⁸, tem sido recomendada como desinfetante, impedindo a proliferação de microrganismos¹⁷. Estudos recentes sobre o uso de fitoterápicos como agente de desinfecção de biomateriais vêm sendo desenvolvidos, e os resultados têm mostrado eficácia antimicrobiana desses compostos¹⁸⁻²⁰. Estudo realizado por Farnesi et al. (2009)²¹, encontrou atividade antibacteriana do extrato de própolis verde contra *S. aureus*.

O extrato de própolis apresenta, entre outras vantagens, além da eficácia antimicrobiana, a baixa toxicidade, já que não há relatos de casos de efeitos colaterais e poucos casos de alergia e o baixo custo^{21,22}. 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 produzida²³. A principal espécie vegetal visitada pelas abelhas é o alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*, a qual vem sendo estudada no Brasil.

Embora existam atualmente no mercado alguns produtos já bem estabelecidos de higienização para próteses intra-orais e lentes de contato oculares, não se tem o mesmo para desinfecção de próteses faciais. A grande maioria dos estudos são direcionados à limitação da microbiota aderida aos materiais utilizados em próteses dentárias. Adicionalmente, deve-se considerar a especificidade da microbiota patogênica na região de bordas cirúrgicas em pacientes portadores de defeitos faciais, bem como a possibilidade de materiais utilizados na confecção 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 faciais. 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.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia de soluções à base de extrato de própolis verde comparativamente às soluções convencionais na remoção do biofilme contendo uma espécie de estafilococos, desenvolvido em superfície de elastômero de silicone utilizado em prótese facial.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a eficácia do tratamento com solução de extrato de própolis verde, variando a concentração e o tempo de aplicação, na remoção do biofilme de estafilococos, sobre a superfície do elastômero de silicone facial.
- Verificar *in vitro* o tratamento com solução de extrato de própolis comparativamente a outras soluções desinfetantes convencionais, na remoção do biofilme de estafilococos, sobre a superfície do elastômero de silicone facial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foi utilizado o silicone facial incolor (Silicone Grau Médico MDX 4-4210®, Dow Corning Corporation, Midland, MI, EUA) de polimerização por temperatura ambiente, podendo esta ser acelerada por calor. A partir disso, foram confeccionados 90 discos de silicone que serviram como substratos para o desenvolvimento do biofilme bacteriano.

Confecção dos discos de elastômero de silicone facial

Para a padronização dos discos de silicone obtidos pelo elastômero de silicone MDX 4-4210® 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, que corresponderam as dimensões dos discos de silicone. Esta matriz 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 silicone não se aderisse às placas de vidro após sua polimerização. Em seguida, as proporções da base/catalisador do elastômero de silicone foram previamente pesadas em balança digital de precisão, de acordo com as instruções do fabricante, e misturadas com uma espátula de aço inoxidável sobre papel A4 fixado em bancada, em temperatura ambiente de 23 ($\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa de 50 ($\pm 10\%$). Após a obtenção de uma mistura homogênea do silicone, esta foi inserida no interior da matriz metálica e o conjunto levado sob pressão de aprox. 40 psi ou lb/in², à temperatura de aprox. 115 ($\pm 3^\circ\text{C}$), durante 15 minutos (Polimerizadora elétrica; Metal Vander, Jaraguá, SP, Brasil), para a remoção das bolhas de ar formadas durante o procedimento de manipulação^{6, 8}. Em seguida, a pressão foi removida e a matriz com os discos confinados em seu interior foi mantida durante 15 minutos na polimerizadora, de forma a obter a cura acelerada do material. Após isso, os discos de silicone permaneceram em repouso, à temperatura ambiente, durante 3 horas, para estabilização e completa polimerização do material.

Posteriormente, todos os discos de silicone facial foram submetidos à limpeza em água filtrada por 10 minutos, para remoção de debris em sua superfície e, após

isso, foram deixados ao ar livre, em ambiente asséptico, para secagem. Em seguida, os discos de silicone foram esterilizados por óxido de etileno²⁴, pela empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, para eliminação de possíveis microrganismos remanescentes.

Tabela 1 – Número de discos de elastômero de silicone facial para cada grupo de solução testada no estudo e para cada período de tempo de imersão (n=6).

Soluções														
Grupo Controle						Grupo Teste								
CRTA			CHX4			SAPV			SEPV			ATDB		
10 min	15 min	30 min	10 min	15 min	30 min	10 min	15 min	30 min	10 min	15 min	30 min	10 min	15 min	30 min
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Cultivo bacteriano

As amostras de *S. aureus* (ATCC 25923) foram utilizadas neste estudo. Para o preparo do inóculo, as amostras foram mantidas a -86°C em caldo Brucella (Difco, Sparks, MD, EUA) contendo 10% de glicerol e semeadas em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco), e incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24 horas. As culturas foram inoculadas em um tubo falcon contendo 5mL de Tryptic Soy Brouth (TSB) (Difco) sem dextrose suplementado com 1% de glucose (TSB w/ dextrose; Difco) e incubadas a 37°C, por 24 horas, a fim de obter células em fase exponencial¹². Após este período, a densidade óptica foi mensurada por espectrofotômetro (MicroNal B542) a fim de estabelecer a concentração de 0,5 a 600nm²⁵.

Implantação do biofilme

Em um fluxo, os discos de silicone 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 contendo 1 mL de TSB sem dextrose suplementado com 1% de glucose. Em

seguida 1µl de inócuo bacteriano, *S. aureus*, na concentração de 10^8 células/mL¹² foi adicionado no caldo de 1mL do TSB contido em cada de poço da placa. O material foi incubado a 37°C, com agitação de 100 rpm (OPAQ I10-OE; Incubadora-OVAN, Espanha), durante 48 horas¹⁴. Após as primeiras 24 horas, os discos de silicone foram removidos com pinça estéril e lavados duas vezes, em uma nova placa de cultura de 24 poços, com 1ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 (PBS), a fim de remover as células fracamente aderidas. Em seguida, os discos foram transferidos para uma nova placa de cultura de 24 poços contendo 1ml do caldo TSB sem dextrose, suplementado com 1% de glucose e levados novamente para o agitador para a formação do biofilme.

Tratamentos de desinfecção

Após o período de incubação de 48 horas, os discos de silicone seguiram imediatamente ao tratamento com as soluções proposta no estudo: solução etanólica de extrato de própolis verde a 10% (SEPV) com clorofila (Pharmanectar, Belo Horizonte, Brasil), solução aquosa de extrato de própolis verde a 10% sem clorofila (Pharmanectar) (SAPV), agente antimicrobiano específico para prótese facial (ATDB) (B-200-09 Daro Brand; Factor II Inc., EUA), gluconato de clorexidina a 4% (CHX4) (Droga Clara, Belo Horizonte, Brasil) como controle negativo, e água destilada (CRTA) como controle positivo.

Os discos de silicone foram aleatoriamente distribuídos aos grupos de tratamento (n=6) para cada tratamento de desinfecção proposto. Para todos os tratamentos foram avaliados três períodos de tempo (10 min, 15 min ou 30 min)^{8-10,17,18}. Os tratamentos de desinfecção foram realizados em ambiente asséptico, de forma que os discos colonizados da placa de 24 poços foram retirados e imergidos, individualmente, em uma nova placa de cultura de 24 poços contendo 1mL de cada solução desinfetante durante o período determinado, para, posteriormente, ser lavado duas vezes em 1mL de PBS, em uma nova placa de cultura de 24 poços. Para o tratamento com ATDB o frasco contendo o produto foi agitado manualmente por 20 segundos previamente a colocação na placa 24 poços. Após a limpeza os discos de silicone foram imersos separadamente em 4 ml de PBS contido em tubos falcon.

Contagem das células do biofilme

Para o desprendimento do biofilme aderido aos discos de silicone, cada tubo falcon contendo o disco foi individualmente agitado em vortex três vezes (7 W durante 60 s, com pausa de 2 min entre cada agitação). Em seguida, os discos foram removidos dos tubos e as soluções foram diluídas em série em solução salina (NaCL). Cada 100 µL de diluição foram semeados no meio TSA em placa petri. As placas petri foram incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24 horas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)^{13,15} foi estimado de uma contagem entre 30 e 300 de UFC.

Análise Estatística

Os dados foram analisados com o software XLSTAT for Microsoft Excel (Copyright © 2015 Addinsoft, EUA). A transformação Box-Cox foi utilizada para a obtenção de dados em acordo com a distribuição normal para o teste de Kolmogorov-Smirnov ($P=0.09$). 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: tratamentos desinfetantes e períodos. As diferenças significantes nos valores obtidos na ANOVA foram comparados por teste de Tukey-Kramer HSD em nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

Os discos de silicone tratados com SEPV e CHX4-controle negativo não apresentaram UFCs para os períodos de desinfecção avaliados contra a cepa de *S. aureus*, o que vem ressaltar o amplo espectro antibiofilme destes dois tratamentos. Devido a isso, os tratamentos SEPV e CHX4 não foram considerados na análise de variância (ANOVA). No teste ANOVA para In, pode-se verificar diferença estatística significativa para o fator tratamento ($p < 0,001$), e a interação entre tratamento e período apresentou-se no limiar de significância ($p = 0,046$) (tabela 2). No entanto, não houve diferença estatística significativa para o período isoladamente (tabela 2; $p = 0,088$), independente dos outros fatores.

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

Fatores de variação	gl	SQ	QM	F	P
Período	2	18,496	9,248	2,569	0,088
Tratamento	2	397,990	198,995	55,270	<0,0001*
Período×tratamento	4	38,074	9,518	2,644	0,046*
Erro	2	18,496	9,248	2,569	
Total	2	397,990	198,995	55,270	

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

Os valores médios e os desvios padrões de UFC para cada tratamento desinfetante, independente do período de desinfecção estão apresentados na figura 1. A figura 2 apresenta a placa petri para contagem de UFC do tratamento SAPV no período de 15 min. Pode-se verificar entre os tratamentos, menor número de UFC para os discos de silicone tratados com ATDB (UFC=7,68E+03) e SAPV (UFC=2,48E+05), com diferença estatisticamente significativa (tabela 2, figura 1; $p < 0,001$), em relação ao CRTA-controle negativo (UFC=1,16E+06). Além disso, os

discos tratados com ATDB apresentaram menor número de UFCs, estatisticamente significativa (figura 1; $p<0,001$) em relação ao SAPV.

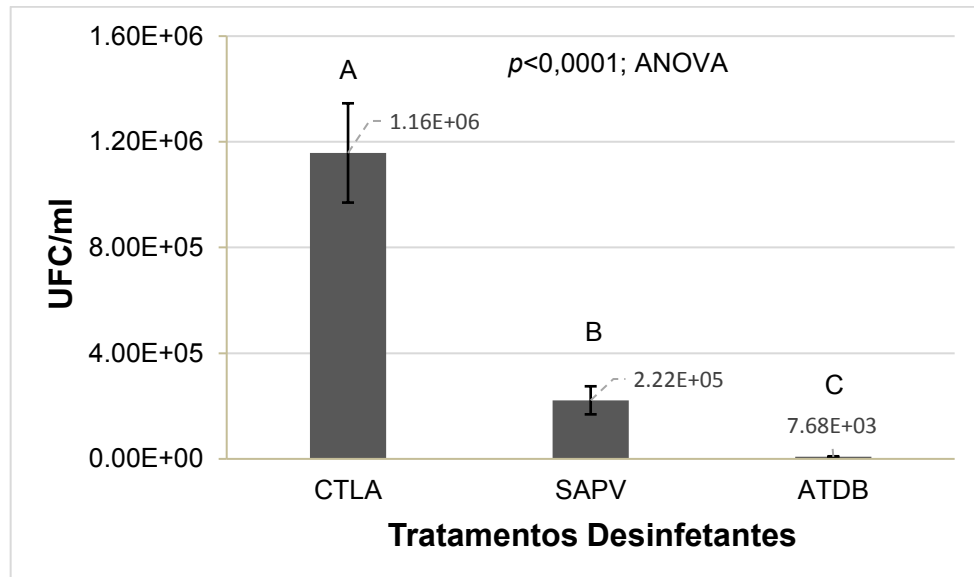


Figura 1 – Média e erro padrão do número de células aderidas de *S. aureus* (ATCC 25923) por mL para cada tratamento desinfetante, independente do período de desinfecção. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos desinfetantes ($p<0,0001$; ANOVA).

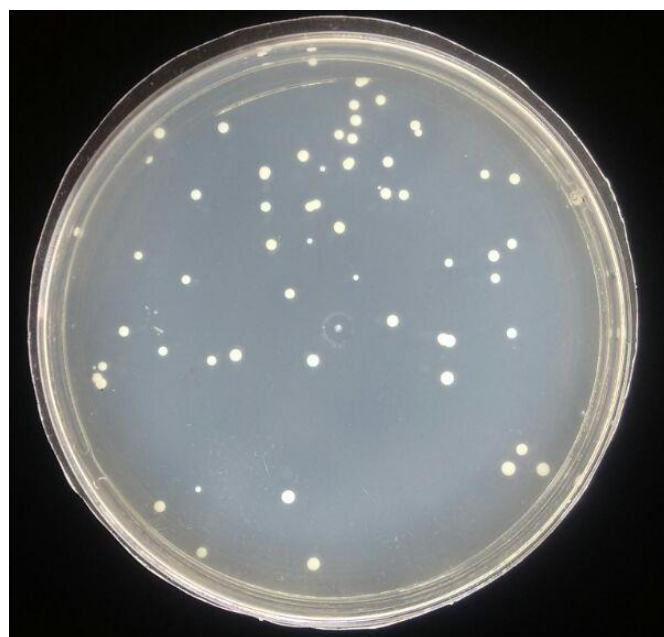


Figura 2 – Placa Petri com a presença de colônias formadas por mililitro.

No entanto, considerando a interação tratamento e período para o número de UFC, cada tratamento não apresentou diferença estatisticamente significativa (figura 3; $p>0,05$) entre os períodos de desinfecção, com exceção do SAPV entre 10 (UFC=5,93E+05) e 30 minutos (UFC=2,75E+03).

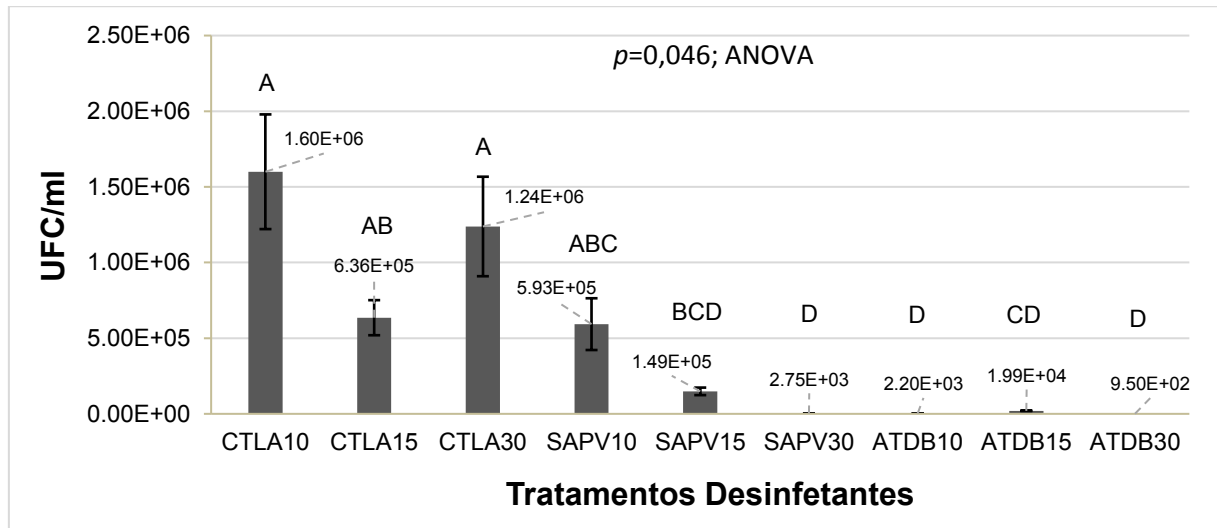


Figura 3 – Média e erro padrão do número de células aderidas *S. aureus* (ATCC 25923) por mL para cada tratamento desinfetante e período de desinfecção. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos e desinfetantes e períodos respectivamente. ($p=0,046$; ANOVA).

5 DISCUSSÃO

O estudo testou a ação antimicrobiana de tratamentos com soluções desinfetante simulando, *in vitro*, as condições do crescimento estático do biofilme superficial, que se encontram em próteses faciais. O sucesso da colonização bacteriana na superfície do silicone facial depende da adesão inicial de microrganismos, pois quando a bactéria se adere e se prolifera no material há a formação de substâncias poliméricas extracelulares promovendo a formação do biofilme, como forma de proteção em ambientes externos^{12, 14}. Com isso, a adesão bacteriana depende de vários fatores para ocorrer, entre eles a sua patogenicidade, além das características influentes do biomaterial²⁶. Adicionado a isso, a ação de um desinfetante contra microrganismos em biofilmes pode variar no tempo e no espaço. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa para o período de desinfecção (tabela 2; $p=0,088$).

Pode-se verificar neste estudo, que todos os tratamentos avaliados apresentaram eficácia antimicrobiana nos devidos períodos de desinfecção em relação a remoção do biofilme bacteriano superficial aderido ao silicone protético facial. A solução etanólica de extrato de própolis verde a 10% apresentou amplo espectro antibiofilme, pois não houve formação de UFC, com resultado idêntico ao controle positivo de gluconato de clorexidina a 4%, agente antimicrobiano solidificado na literatura¹⁷. A clorexidina é um composto sintético derivado a partir de bis-biguanida com elevado nível de atividade antimicrobiana, que em pequenas concentrações de sais de clorexidina, são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou exterminar espécies bacterianas^{17,27}.

As ações hepatoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante da própolis já são comprovadas e utilizadas desde a antiguidade como terapia²⁸. A composição e atividade biológica da própolis verde brasileira (PVB), *Baccharis dracunculifolia*, apresenta terpenoides e derivados de ácido pré-diluídos de cumamina, além de flavonoides^{29,30}. Assim a PVB é uma mistura natural e poderosa fonte de novos agentes antibacterianos e antifúngicos³¹. A principal ação antimicrobiana da própolis advém da presença de flavonoides, ácidos fenólicos e

derivados em sua composição que são capazes de promover dano estrutural na membrana e/ou na parede celular de bactérias^{21,30,32,33}. Além disso, estudos prévios ressaltam que apenas um único componente/substância isolada da própolis não possui maior atividade antibacteriana comparada ao extrato total^{22,33,34}. Portanto é interessante que as soluções ou polímeros derivados extraídos da própolis sejam resultante da combinação de vários componentes a partir do extrato bruto.

Para obter as ações terapêuticas, a própolis não deve ser utilizada em sua forma bruta e sim purificada, sendo preparada com solventes, como a água e o etanol (utilizados no presente estudo), para preservar os componentes ativos e eliminar o material indesejado^{29,30}. O etanol como solvente permite a extração seletiva de alguns componentes do extrato diretamente relacionados a atividades antimicrobianas²². O amplo espectro antibiofilme da solução etanólica de própolis verde a 10% encontrado neste estudo pode ser atribuído justamente a extração seletiva de componentes auxiliada pelo solvente etanol. Em relação ao tratamento realizado com solução aquosa de própolis verde a 10% pode-se verificar a formação de UFC, com diferença significativa em relação ao controle com água destilada. Assim pode-se sugerir que as diferenças dos efeitos entre ambas as soluções de própolis do presente estudo são devido ao método de extração com consequente diferença entre os componentes extraídos e suas combinações.

Os resultados deste estudo corroboram com outros estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana relacionada a bactérias e fungos, entre eles *S. aureus* e *C. albicans* com o uso de extrato de própolis na microbiota oral. Pina et al. (2017)³⁵ avaliaram a eficácia de um gel de extrato de própolis brasileira para erradicar espécies de *Candida spp.* oral e verificaram atividade antimicrobiana promissora do produto. Enquanto Acka et al. (2016)³⁶ compararam a eficácia antimicrobiana do extrato etanólico de própolis ao gluconato de clorexidina frente à diversos patógenos, constatando a sua eficácia em biofilmes orais. Ainda em concordância com nossos resultados, tais autores, concluíram que o extrato de própolis verde pode ser alternativa de tratamento, comparativamente à medicamentos já utilizados. Neste contexto, as soluções de própolis avaliadas neste estudo podem ser alternativas eficazes como agente desinfetante para próteses faciais, em particular a solução etanólica devido ao amplo espectro.

Além disso, no presente estudo, pode-se observar menor número de UFC para os discos tratados com antimicrobiano específico para prótese facial,

estatisticamente significativa em relação à solução aquosa de extrato de própolis verde a 10%. Este fato pode ser atribuído a alguma particularidade nos reagentes do produto. No entanto, nenhuma informação sobre seus componentes foi encontrada na literatura ou disponibilizada nas suas instruções de uso. É importante ressaltar a vantagem da ausência de coloração do produto, o que o torna atrativo como agente desinfetante, uma vez que visualmente não interfere na estética das próteses faciais.

Entre as limitações deste estudo aponta-se a possibilidade das soluções de própolis em ocasionar alguma alteração das propriedades físicas e mecânicas nos materiais de uso em próteses faciais como alteração de cor, principalmente pela presença da substância clorofila, que pode prejudicar na estética e inviabilizar a prótese a longo prazo. Além disso, a diminuição da dureza e alteração da estabilidade dimensional também podem vir a prejudicar na borda e retenção da prótese.

Contudo, convém ressaltar que a avaliação de biofilmes isolados pode limitar o crescimento bacteriano por não proporcionar as condições ambientais ideais que este encontraria em contato com o tecido adjacente a prótese facial. Desta forma, deve-se continuar a investigar produtos alternativos e eficazes a patogenidade microbiana e que também promovam conforto e estética satisfatória à reabilitação de portadores de defeitos faciais.

6 CONCLUSÕES

- Todas as soluções desinfetantes do estudo apresentaram eficácia antimicrobiana para os períodos avaliados.
- A solução etanólica de extrato própolis verde a 10% apresentou total espectro na remoção do biofilme de *Staphylococcus aureus* na superfície de silicone facial protético, igualando-se ao gluconato de clorexidina a 4%.
- Os tratamentos desinfetantes com antimicrobiano específico Daro Brand® e solução aquosa de extrato própolis verde a 10% apresentaram menor número de UFC quando comparado ao controle com água destilada.

REFERÊNCIAS

1. ALFENAS, E.R.; MORENO, A.; TANNER, P.B.; NETTO, H.D.; FONSECA, M.F.L.; RIOS, F.G. Management of peri-implant hypertrophic scarring for an ear prosthesis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *In Press*, 2017
2. BRANDÃO, T.B.; FILHO, A.J.V.; BATISTA V.E.S.; RIBEIRO, A.C.P.; FILHO, H.N.; CHILVARQUER, I.; NUNN, M.E.; SANTOS-SILVA, A.R.; BARÃO, V.A.; WEE A. Assessment of treatment outcomes for facial prostheses in patients with craniofacial defects: A pilot retrospective study. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *In Press*, 2017
3. BEUMER III. J. et al. Rehabilitation of Facial Defects. In BEUMER III. J.; MARUNICK, M.T.; ESPOSITO, S.J. *Maxillofacial Rehabilitation: Prosthodontic and Surgical Management of Cancer-Related, Acquired, and Congenital Defects of the Head and Neck*. 3. ed., Cleveland: Quintessence Publishing Co, 2011. p. 255-314
4. COBEIN, M.V.; COTO, N.P.; CRIVELLO JUNIOR, O.; LEMOS, J.B.D.; VIEIRA, L.M.; PIMENTEL, M.L.; BYRNE, H.J.; DIAS, R.B. Retention systems for extraoral maxillofacial prosthetic implants: a critical review. *British Journal Oral and Maxillofacial Surgery*, Edinburgh, Apr, 2017
5. BECKER, C.; Becker A.M.; PFEIFFER J. Health-related quality of life in patients with nasal prosthesis. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery*, Stuttgart, vol 44, no. 1, p. 75-79, Jan, 2016
6. HADDAD, M.F.; GOIATO, M.C.; DOS SANTOS, D.M.; MORENO, A.; D'ALMEIDA, N.F.; PESQUEIRA, A.A. Color stability of maxillofacial silicone with nanoparticle pigment and opacifier submitted to disinfection and artificial aging. *Journal of Biomedical Optics*, Bellingham, vol 16, no. 9, Sep, 2011
7. DOS SANTOS, D.M.; GOIATO, M.C.; MORENO, A.; PESQUEIRA, A.A.; DEKON, S.F.C.; GUIOTTI, A.M. 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*, vol. 97, no.8, Aug, 2012

8. GOIATO, M.C.; HADDAD, M.F.; Sinhoreti MA, DOS SANTOS, D.M.; PESQUEIRA, A.A.; MORENO, A. Influence of opacifiers on dimensional stability and detail reproduction of maxillofacial silicone elastomer. BioMedical Engineering OnLine, London, 2010. Disponível em: <<https://biomedical-engineering-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-925X-9-85>>. Acesso em: 05 jun. 2017
9. ARIANI, N.; VISSINK, A.; OORT R.P.V.; KUSDHANY, L.; DJAIS A.; RAHARDJO, T.B.; MEI, H.C.V.D.; KROM, B.P. Microbial biofilms on facial prostheses. Biofouling, Chur, vol. 28, no. 6, Jun, 2012.
10. GOIATO, M.C.; ZUCOLOTTI, B.C.; MANCUSO, D.N.; dos SANTOS, D.M.; PELLIZZER, E.P.; VERRI, F.R. Care and cleaning of maxillofacial prostheses. Journal Craniofacial Surgery, Burlington, vol. 21, no. 4, pag 1270-1273, Jul, 2010
11. PARANHOS, R.M.; BATALHÃO, C.H.; SEMPRINI, M.; REGALO, S.C.H.; ITO, I.Y.; de MATTOS, M.G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. Journal of Applied Oral Science, Bauru, vol. 15, no. 1, pag 33-38, Jan, 2007
12. HENRIQUES, M.; SOUSA, C.; LIRA, M.; ELISABETE, M.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to silicone-hydrogel contact lenses. Optometry and Vision Science Journal, Baltimore, vol. 82, no. 6, p. 446-450, Jun, 2005
13. GAÁL, V.; KILÁR, F.; ACS, B.; SZIJJÁRTÓ, Z.; KOCSIS, B.; KUSTOS, I. In vitro study of antibiotic effect on bacterial adherence to acrylic intraocular lenses. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Amsterdam, vol. 45, no. 3-4, p. 125-130, Nov, 2005
14. ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials, Guilford, vol. 33, no. 26, Sep, 2012
15. VIEIRA, A.P.C.; SENNA, P.M.; da SILVA, W.J.; CURY, A.A.D.B. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida spp.* biofilm recolonization on liner surface. Brazilian Oral Research, São Paulo, vol. 24, no.3, p. 342-348, Jul, 2010

16. MONTAGNER, H.; MONTAGNER, F.; BRAUN, K.O.; PERES, P.E.; GOMES, B.P. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. *Journal of Applied Oral Science*, Bauru, vol. 17, no. 5, Sep, 2009
17. KARPANEN TJ, WORTHINGTON T, HENDRY ER, CONWAY BR, LAMBERT PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, London, vol. 62, no. 5, Nov, 2008
18. GUIOTTI, A.M.; GOIATO, M.C.; dos SANTOS, D.M.; VECHIATO-FILHO, A.J.; CUNHA, B.G.; PAULINI, M.B.; MORENO, A.; de ALMEIDA, M.T. Comparison of conventional and plant-extract disinfectant solutions on the hardness and color stability of a maxillofacial elastomer after artificial aging. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, Guilford, vol. 115, no. 4, p. 501-508, Apr, 2015
19. CAPISTRANO, H.M.; ASSIS, E.M.; LEAL, R.M.; ALVAREZ-LEITE, M.E.; BRENER, S.; BASTOS, E.M. Brazilian Green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, Oxford, Apr, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/947980/>>. Acesso em: 05 jun. 2017
20. SANTOS, V.R.; GOMES, R.T.; de MESQUITA, R.A.; de MOURA, M.D.; FRANÇA, E.C.; de AGUIAR, E.G.; NAVES, M.D.; ABREU, J.A.; ABREU, S.R. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Research*, London, vol. 22, no.11, p. 1544-1547, Jan, 2008
21. FARNESI, A.P.; AQUINO-FERREIRA, R.; de JONG, D.; BASTOS, J.K.; SOARES, A.E. Effects of stinglessbee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, vol. 8, no.2, p. 635-640, Jun, 2009
22. SANTOS, V.R.; PIMENTA, F.J.; AGUIAR, M.C.; DO CARMO, M.A.; NAVES, M.D.; MESQUITA, R.A. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytother Res*, London, vol. 19, no. 7, 2005
23. KORU, O.; TOKSOY, F.; ACIKEL, C.H.; TUNCA, Y.M.; BAYSALLAR, M.; USKUDAR GUCLU, A.; AKCA, E.; OZKOK TUYLU, A.; SORKUN, K.; TANYUKSEL, M.; SALIH, B. In vitro antimicrobial activity of propolis samples

from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, London, vol. 13, no. 3 – 4, p. 140 – 145, Jun – Aug, 2007

24. MONTEIRO, D.R.; GORUP, L.F.; TAKAMIYA, A.S.; de CAMARGO, E.R.; FILHO, A.C.; BARBOSA, D.B. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *Journal Prosthodont*, Philadelphia, vol. 21, no.1, p. 7-15, Feb, 2011

25. DIAS-SOUZA, M. V.; ANDRADE S.; AGUIAR A. P.; MONTEIRO A. Evaluation of Antimicrobial and Anti-biofilm activities of *Anacardium occidentale* stem bark extract. *Journal of Natural Products*, India, Janeiro de 2013. Disponível em: <http://www.journalofnaturalproducts.com/Volume6/26_Res_paper-25.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2017.

26. YODA, I. et al. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiology*, Londres, v. 14, p. 234, Set, 2014.

27. ALTIERI KT, SANITÁ PV, MACHADO AL, GIAMPAOLO ET, PAVARINA AC, VERGANI CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of the American Dental Association*, Chicago, vol. 143, no. 3, Mar, 2012

28. MIGUEL, M.G.; ANTUNES, M.D. Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, Mumbai, vol. 3, no.4, p. 479-495, Nov, 2011

29. PEREIRA, E.M.; da SILVA, J.L.; SILVA, F.F.; de LUCA, M.P.; FERREIRA, E.F.; LORENTZ, T.C.; SANTOS, V.R. 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

30. PAULA AMB, GOMES RT, SANTIAGO WK, DIAS RS, CORTÉS ME, SANTOS VR. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharmacologyonline*, vol.3, p. 467-473, Dec, 2006

31. SAWAYA, A.C.; CUNHA I.B.S.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, London, vol. 5, no. 1, p. 27, Jun, 2011

32. BOYANOVA, L.; KOLAROV, R.; GERGOVA, G; MITOV, I. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, London, vol. 12, no.4, p. 173 – 177, Aug, 2006
33. SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, João Pessoa, vol. 18, no. 1, p. 84-89, Jan – Mar, 2008
34. CHAN, G.C.; CHEUNG, K.W.; SZE, D.M. The immunomodulatory and anti-cancer properties of propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, Totowa, vol. 44, no. 3, p. 262-273, Jun, 2013
35. PINA, G.M.; LIA, E.N.; BERRETTA, A.A.; NASCIMENTO, A.P; TORRES, E.C.; BUSZINSKI, A.F.; DE CAMPOS, T.A.; COELHO, E.B.; MARTINS, V.P. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, no. 8971746, Mar, 2017
36. AKCA, A.E.; AKCA, G.; TOPÇU, F.T.; MACIT, E.; PIKDÖKEN, L.; ÖZGEN IŞ. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, New York, vol. 2016, no. 3627463, Feb, 2016

APÊNDICES

APÊNDICE A – Materiais e equipamentos utilizados no estudo

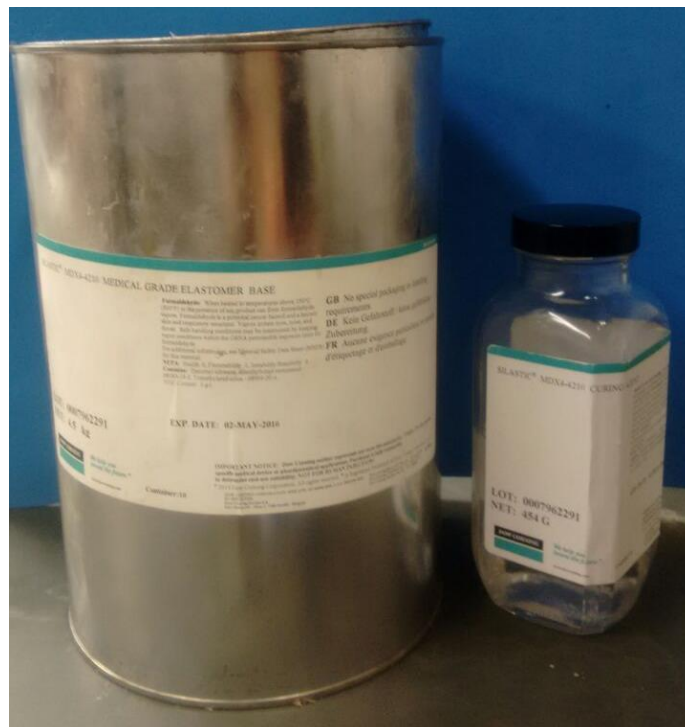


Figura 4 – Elastômero de Silicone Facial (MDX 4-4210; Factor II, EUA)

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 5 – Cepa de *S. aureus* (ATCC 25923)

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 6 – Reagentes de microbiologia: meio de cultura TSA (Difco, EUA), TSB (Difco) e Dextrose (Inlab, Brasil).

FONTE: Arquivo Pessoal.



Figura 7 – Soluções desinfetantes utilizadas como tratamento no estudo: (A) solução etanólica de extrato de própolis verde a 10%-SEPV (Pharmanectar, Brasil); (B) solução aquosa de extrato de própolis verde a 10%-SAPV (Pharmanectar); (C) gluconato de clorexidina 4%-CHX4 (Droga Clara, Brasil); (D) Daro-Brand®-ATDB (Factor II, EUA); (E) água destilada-CTLA.

FONTE: Arquivo Pessoal.



Figura 8 – Alça em T para esfregaço (Inlab, Brasil)

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 9 – Balança digital (Bel engineering, Brasil)

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 10 – Panela Polimerizadora (Metal Vander, Brasil)

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 11 – Espectrofotômetro (B542; MicroNal, EUA)

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 12 – Vortex Mixer (Vortex-Genie 2; DAIGGER, EUA)

FONTE: Arquivo Pessoal

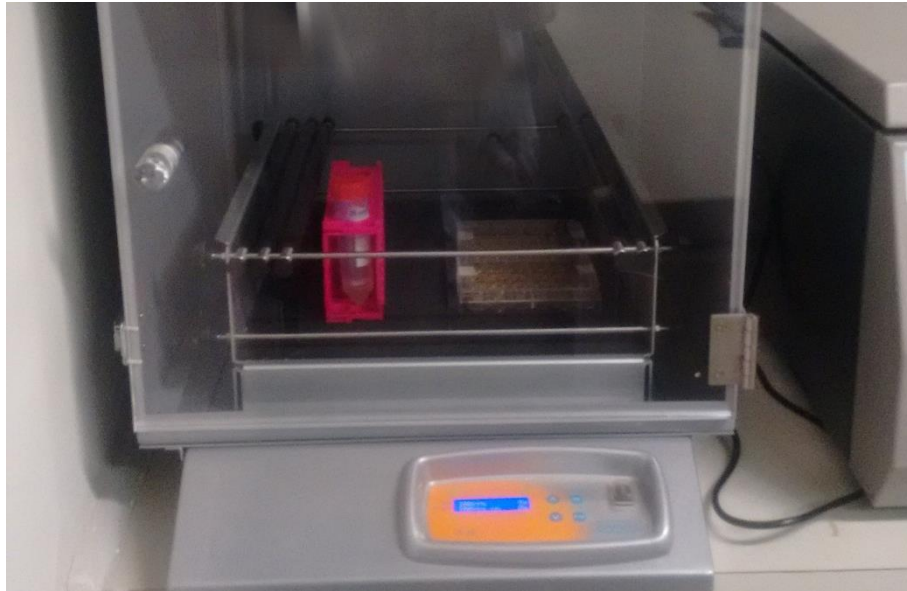


Figura 13 – Incubadora (OPAQ I10-OE; OVAN, Espanha)

FONTE: Arquivo Pessoal

APÊNDICE B – Confecção dos discos de silicone



Figura 14 – Vista superior da matriz metálica

FONTE: Arquivo Pessoal

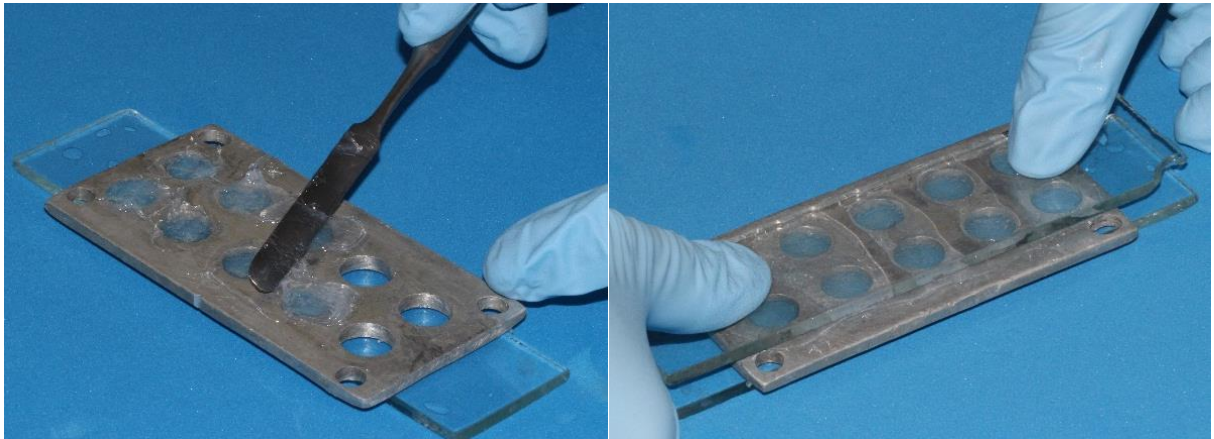


Figura 15 – Inserção do silicone facial no interior dos vazamentos da matriz metálica e posicionamento da placa de vidro sobre esta

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 16 – Interior da panela polimerizadora contendo o conjunto (matriz metálica + silicone facial). FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 17 – Desprendimento dos discos de silicone facial já polimerizados da matriz metálica

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 18 – Discos de silicone facial

FONTE: Arquivo Pessoal

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



Figura 19 – Culturas de *S. aureus* iniciada em TSB e mantidas em crescimento a 37°C

FONTE: Arquivo Pessoal

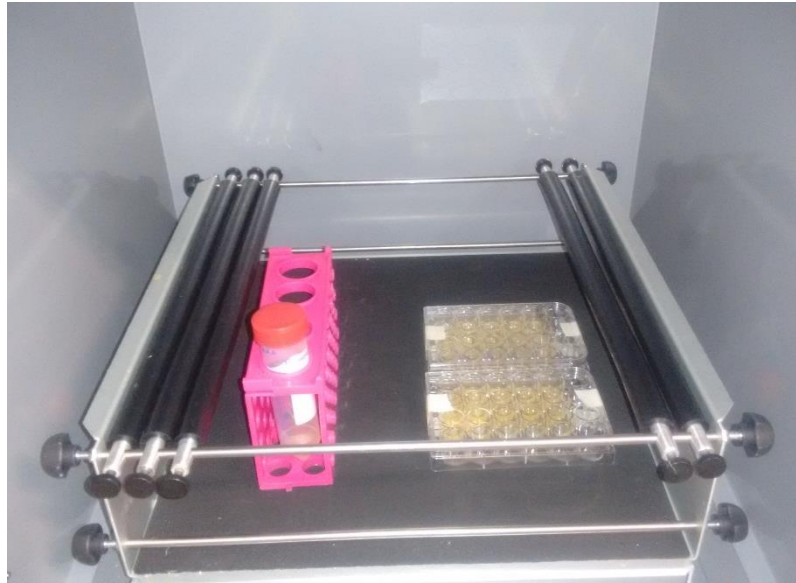


Figura 20 – Discos de silicone em meio de cultura inoculado com *S. aureus* mantidas sob agitação para desenvolvimento do biofilme

FONTE: Arquivo Pessoal

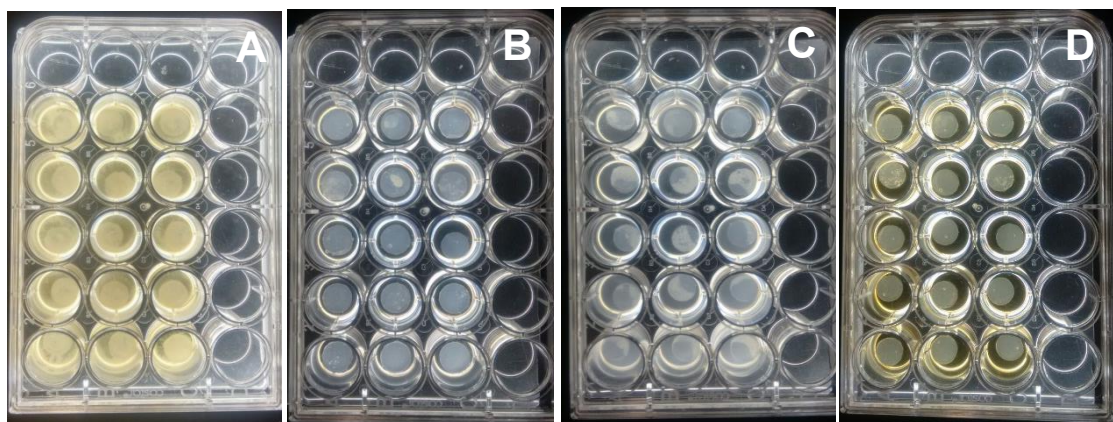


Figura 21 – Discos de silicone na placa 24 poços: (A) placa com os discos imersos em meio contendo a bactéria após 24 horas de crescimento; (B) primeira lavagem com PBS (C); segunda lavagem com PBS; (D) placa com os discos imersos em novo meio de cultura para mais 24 horas de crescimento

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 22 – Discos de silicone imersos no meio de cultura inoculado com *S. aureus* após 48 horas de desenvolvimento do biofilme

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 23 – Desinfecção das amostras após desenvolvimento do biofilme

FONTE: Arquivo Pessoal



Figura 24 - (A) Desprendimento do biofilme por vortex e (B) tubo falcon contendo o disco de silicone e 4 ml de PBS após agitação

FONTE: Arquivo Pessoal



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

FONTE: Arquivo Pessoal

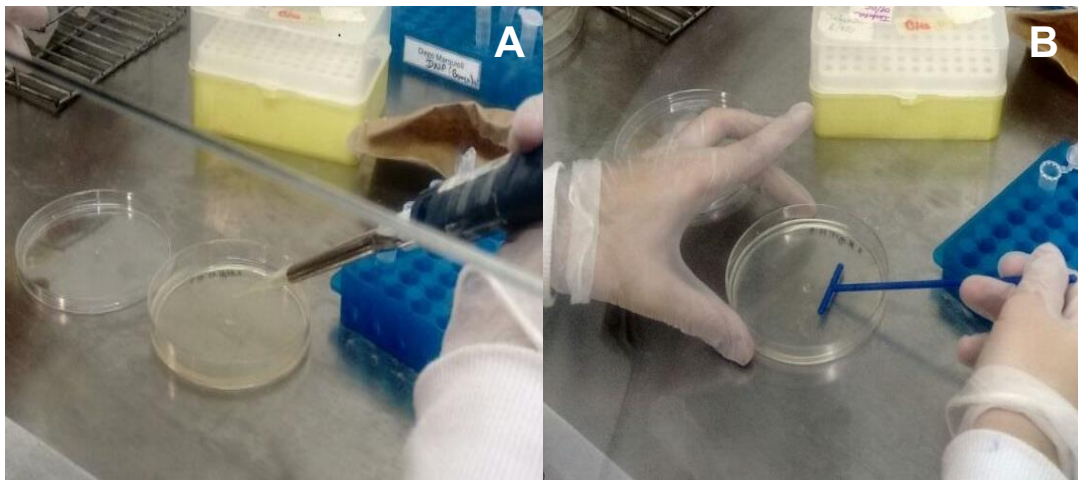


Figura 26 – Procedimento de espalhamento da diluição seriada na placa petri contendo TSA: (A) Infiltração de 100 μ L de cada diluição na placa petri e (B) espalhamento do conteúdo com alça em T.

FONTE: Arquivo Pessoal

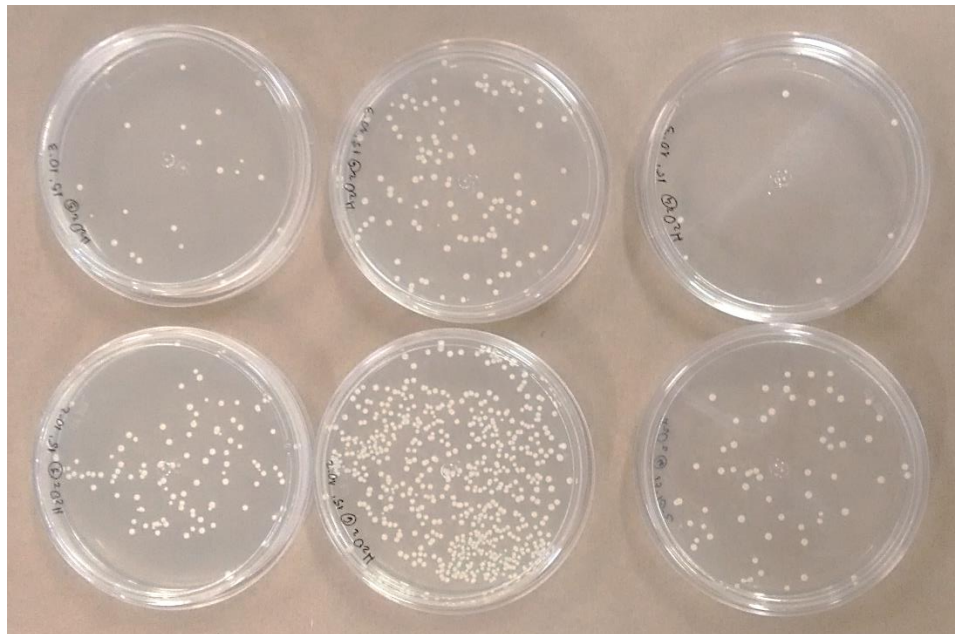


Figura 27 – Placas Petri após incubação a 37°C por 24 horas pronta para contagem do número de colônias formadas por mililitro

FONTE: Arquivo Pessoal

