UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Juliana Barchelli Pinheiro

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE PRÓTESES
BUCOMAXILOFACIAIS E TECIDOS ADJACENTES E AVALIAÇÃO DA
EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE
HIGIENE E DE SEUS EFEITOS SOBRE PROPRIEDADES DE DOIS
SILICONES

Ribeirão Preto

2016

Juliana Barchelli Pinheiro

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE PRÓTESES
BUCOMAXILOFACIAIS E TECIDOS ADJACENTES E AVALIAÇÃO DA
EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE
HIGIENE E DE SEUS EFEITOS SOBRE PROPRIEDADES DE DOIS
SILICONES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Doutora no Programa
de Reabilitação Oral.

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato
da Silva.

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2016

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE
ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Pinheiro, Juliana Barchelli

Identificação da microbiota de próteses bucomaxilofaciais e tecidos adjacentes e avaliação da efetividade antimicrobiana de diferentes protocolos de higiene e de seus efeitos sobre propriedades de dois silicones. Ribeirão Preto, 2016.

189p. : il.; 30 cm

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Silva-Lovato, Cláudia Helena.

1. Prótese Maxilofacial.
2. Silicones.
3. Teste de Materiais.
4. Microbiologia.
5. Desinfecção.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Barchelli Pinheiro

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE PRÓTESES BUCOMAXILOFACIAIS E TECIDOS
ADJACENTES E AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES
PROTOCOLOS DE HIGIENE E DE SEUS EFEITOS SOBRE PROPRIEDADES DE DOIS
SILICONES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Doutora no Programa
de Reabilitação Oral.

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a).Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a).Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a).Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À **Deus**, por sempre me conceder serenidade nos momentos decisivos e coragem para encarar os desafios do cotidiano.

Ao meu querido marido **Alan Grupioni Lourenço** por todo amor, cuidado, compreensão e apoio em todos os momentos. Sua presença alegria os meus dias e torna a caminhada da vida serena e repleta de boas surpresas. As palavras escritas aqui são pequenas e incapazes de descrever o meu sentimento por você. Obrigada por estar ao meu lado durante esta jornada e em tantas outras de nossas vidas. É muito bom compartilhar todos os sonhos com você.

Aos meus amados pais **Samuel Gomes Pinheiro** e **Luzia Aparecida Barchelli Pinheiro**, que sempre estão ao meu lado. Agradeço pelo apoio, incentivo e por toda ajuda sempre. Muitas vezes vocês renunciaram seus sonhos, para que eu pudesse viver os meus. Serei eternamente grata. Amo vocês!

Aos meus queridos sogros **Antônio Batista Lourenço** e **Maria de Lourdes Grupioni Lourenço**. A presença constante nos bons e maus momentos, incentivando-me na superação das dificuldades e me impulsionando na busca dos meus sonhos e ideais, são lembranças que levarei comigo para sempre. Amo vocês!

A minha querida irmã **Aline** e meu cunhado **Lucas**, que são grandes companheiros, amigos e incentivadores. Desejo que todos os seus sonhos se realizem e que possamos estar juntos em todos os momentos. Tenho muito orgulho do amor e amizade que existe entre nós e peço a Deus para que nossos laços sejam fortalecidos dia a dia. Agradeço também ao imenso presente que me concederam meu afilhado **Bruno**, fonte diária de alegria. Amo vocês!

A todos os meus familiares que, de forma direta ou indireta, sempre estão me incentivando e torcendo por mim. Apesar da distância, sempre tenho vocês em meu coração.

A vocês, dedico este trabalho.

Agradecimento Especial

A minha orientadora **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**. Não conseguirei expressar nessas poucas palavras todo o carinho e admiração que tenho pela Sra. e por seu trabalho. Obrigada por estar ao meu lado nessa longa jornada onde tanto aprendi. Nossas reuniões sempre foram fonte de inspiração e seu entusiasmo e dedicação à profissão sempre foram meu maior incentivo. Sentirei muita saudade da pós-graduação e, principalmente da nossa convivência diária e de sua imensa generosidade. Abençoadas são as pessoas que têm o privilégio de trabalhar, conviver e conhecer pessoas como você. Guardarei todos os momentos em meu coração e desejo que nossos caminhos sempre se cruzem. Deixo aqui o meu respeito, eterna gratidão, admiração e amizade.

Agradecimientos

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual reitor **Prof. Dr. Marco Antônio Zago**, e do vice-reitor **Prof. Dr. Vahan Agopyan**, e à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor, **Prof. Dr. Waldemar Mallet da Rocha Barros**, e da vice-diretora, **Prof.^a Dr.^a Léa Assed Bezerra da Silva**, por me receberem de portas abertas durante os anos de graduação e pós-graduação.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, **Prof.^a Dr.^a Rossana Pereira de Almeida Antunes** e do vice-coordenador, **Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro**, pelas oportunidades profissionais, amizade e conhecimentos adquiridos.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de doutorado concedida. Pude me dedicar integralmente à pós-graduação e vivenciar oportunidades profissionais que nunca imaginei alcançar. A reserva técnica da bolsa foi essencial para a realização deste trabalho e para a divulgação dos resultados em congressos científicos nacionais e internacionais. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Cássio do Nascimento**, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho. Admiro o seu comprometimento em tudo o que faz e levarei comigo o seu exemplo. Com certeza grande parte deste trabalho não teria sido possível sem a sua ajuda e ensinamentos. Muito obrigada por tudo!

A Faculdade de Odontologia de São Paulo, FOUSP, que sempre me recebeu de braços abertos, em especial à **Prof.^a Dr.^a Neide Pena Coto** e **Prof. Dr. Reinaldo Brito Dias**, pela disposição, gentileza e colaboração essenciais para a realização deste trabalho. Além disso, agradeço imensamente às alunas de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de São Paulo, que gentilmente me auxiliarem nas coletas microbiológicas nos momentos que passei em São Paulo. Muito Obrigada!

À **Prof.^a Dr.^a Helena de Freitas Oliveira Paranhos**, pelo carinho e momentos de orientação durante a graduação e pós-graduação. A admiro imensamente e me sinto honrada pela convivência que tive com a sra. durante a pós-graduação.

À **Prof.^a Dr.^a Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza**, por sua valiosa contribuição para o fortalecimento do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, durante seu período como coordenadora. Sou grata pelo seu apoio e carinho durante todos os anos em que estive na FORP e levarei comigo o seu exemplo. Aproveito a oportunidade para agradecer também ao **Prof. Francisco Teodorico Pires de Souza** que gentilmente me auxiliou em diversos momentos da minha pós-graduação, com ensinamentos de estatística e elaboração de gráficos. Muito obrigada!

Aos **professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, pela valiosa contribuição para minha formação durante a graduação e pós-graduação. A generosidade e a paciência de todos tornaram a jornada da pós-graduação uma experiência suave e prazerosa. Obrigada por tudo!

À **Prof.^a Dr.^a Marilena Chinale Komesu** e ao amigo **Cristiano Nakao**, pela amizade, carinho e apoio durante todo o período que estive na FORP. Levarei nossa amizade para sempre em meu coração.

À técnica do laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral, **Viviane de Cássia Oliveira**, pela amizade e colaboração em tudo o que fosse preciso. Embora os experimentos tenham sido muitos, compartilhar da sua companhia tornou tudo mais fácil. Vou sentir muita saudade das nossas conversas e de trabalhar ao seu lado. Espero que os nossos caminhos sempre se cruzem. Obrigada por tudo!

À especialista de laboratório **Ana Paula Macedo** por toda ajuda e disponibilidade sempre, nos diversos experimentos e no esclarecimento das muitas estatísticas que fizemos juntas. Muito obrigada!

Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, **Ana Paula Xavier, Fernanda Talita de Freitas e Regiane de C. Tirado Damasceno**, pela paciência e carinho em todos os momentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Isabel Cristina Galino Sola, Regiane Cristina Moi Sacilloto e Mary Possani Carmessano**, pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários do Lipen, **Edson Volta e Ricardo de Souza**, pelo auxílio na realização dos ensaios físico-mecânicos e por toda disponibilidade e colaboração. Ao funcionário do Departamento de Materiais Dentários e Prótese **Serginho**, pela valiosa contribuição em diferentes etapas deste trabalho.

Aos queridos colegas da pós-graduação, **Maurício, Raniel, Frank, Marcela, Daniela, Cláudia, Carla, Carolina, Flávia, Vanessa, Marina Vomero, Nathália, Nathy, Luciana, Marcelo, Adriana, Maria Paula, Tati e Lourenço**, pela convivência harmoniosa e carinho de todos os dias. Desejo que seus sonhos se realizem e que vocês sejam muito felizes.

Aos meus queridos cunhados **Luana, Rafael, Jéssica e Stefen**, pela amizade e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

A todos os meus **famíliares**, pela torcida, carinho e pelas orações.

A todos os **pacientes** que participaram deste estudo, pela confiança, respeito e comprometimento. Espero que esta pesquisa tenha contribuído para melhorar a qualidade de vida de todos vocês. Muito obrigada!

PINHEIRO, J.B. Identificação da microbiota de próteses bucomaxilofaciais e tecidos adjacentes e avaliação da efetividade antimicrobiana de diferentes protocolos de higiene e de seus efeitos sobre propriedades de dois silicones. Ribeirão Preto, 2016. 189p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O objetivo do presente estudo foi identificar, clinicamente, os micro-organismos presentes em próteses e tecidos adjacentes, avaliar laboratorialmente a ação antimicrobiana de diferentes protocolos de higiene sobre os principais micro-organismos identificados e, ainda, avaliar a influência dos protocolos de higiene na alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos, de um novo silicone (Bio-Skin), em comparação ao MDX 4-4210. Para identificação dos micro-organismos, 43 indivíduos portadores de próteses maxilofaciais foram submetidos à colheita do biofilme na região da prótese e tecidos adjacentes e 38 espécies de micro-organismos foram pesquisadas por meio do método de hibridação de DNA *Checkerboard*. A análise da ação antimicrobiana foi conduzida por meio da formação de biofilmes específicos de 6 espécies selecionadas. 288 espécimes pigmentados com pó de maquiagem foram confeccionados com cada material, e distribuídos em grupos para imersão em gluconato de clorexidina a 0,12%, *Ricinus communis* a 10%, e escovação com sabão neutro. Como controle, um grupo foi imerso em água. Para análise da influência dos protocolos de higienização nas propriedades dos silicones, 120 corpos de prova circulares de cada material foram confeccionados (n=10): sem pigmentação (GC: controle), com pó de maquiagem (GP), opacificador (GO) ou opacificador + pó de maquiagem (GPO), para então serem submetidos à higienização: EA (imersão em água destilada + escovação com sabão neutro – controle), ERc10% (imersão em solução de *Ricinus communis* 10% + escovação com sabão neutro) e EC10,12% (imersão em gluconato de clorexidina 0,12% + escovação com sabão neutro). O período de higienização simulou um ano de uso clínico. As variáveis de resposta quantitativas foram mensuradas imediatamente após a obtenção dos espécimes e após a aplicação dos protocolos de higiene e a variação obtida foi utilizada na análise estatística. Para análise da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene e para alteração de cor, dureza Shore A e rugosidade superficial, realizou-se Análise de variância e Teste Complementar de Tukey para comparação das médias. Para a absorção de líquidos, aplicou-se o Teste de Kruskal-Wallis. Para comparação da contagem de micro-organismos presentes nas próteses e tecidos adjacentes empregou-se o Teste de Wilcoxon (Signed-rank Test). Para análise dos dados obtidos pela contagem de UFC, para análise da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene, empregou-se Two-way ANOVA e Teste Complementar de Tukey. Todas as análises

foram conduzidas com nível de significância 5%. O método de hibridação de DNA *Checkerboard* indicou a presença das 38 espécies nas próteses e tecidos adjacentes e foram selecionados os seguintes micro-organismos: *C. glabrata*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Para a análise antimicrobiana, o gluconato de clorexidina a 0,12% foi o mais eficaz, seguido pela escovação mecânica, contra as 6 espécies. A alteração de cor não foi influenciada pelos protocolos de higiene e a menor alteração foi encontrada com o silicone Bio-Skin dos grupos GP e GPO. O silicone MDX apresentou menor variação de dureza Shore A em função do protocolo de higiene EC10,12%, enquanto a dureza do Bio-Skin não foi influenciada pelos protocolos de higiene. A variação da dureza entre os dois silicones foi diferente somente quando submetidos ao protocolo ERc10%. Para a rugosidade superficial, o silicone MDX apresentou a menor variação de rugosidade. A porcentagem de absorção de líquidos do silicone MDX 4-4210 não foi influenciada pela pigmentação ou protocolos de higienização. Para o Bio-Skin, a porcentagem de absorção foi maior nos grupos GC e GO quando submetidos ao protocolo EA. Nota-se que houve uma interação entre pigmento e protocolo de higiene, onde para o silicone MDX, a absorção foi maior quando submetidos ao protocolo EC10,12% e para o Bio-Skin, houve uma maior porcentagem de absorção nos grupo GC e GO associados à escovação e imersão em água e nos grupos GP e GPO associado ao protocolo EC10,12%. Conclui-se que tanto as próteses quanto os tecidos adjacentes apresentam grande quantidade de micro-organismos colonizadores e que cuidados diários de higiene são essenciais. Os protocolos de imersão em gluconato de clorexidina a 0,12% e de escovação mecânica com sabão neutro possuem efetividade antimicrobiana sobre os principais micro-organismos comumente presentes em próteses e tecidos e o silicone MDX 4-4210 apresentou menor contagem de UFC quando comparado ao Bio-Skin. Ambos os materiais apresentaram variações em função das diferentes pigmentações e protocolos de higiene, entretanto, as mesmas foram discretas e dentro de padrões clínicos aceitáveis. As menores alterações foram observadas quando os materiais foram expostos aos protocolos de imersão em gluconato de clorexidina a 0,12% e escovação com sabão neutro.

Palavras-chave: Prótese Maxilofacial, silicones, teste de materiais, microbiologia, desinfecção.

Abstract

PINHEIRO, J.B. Identification of the microbiota of maxillofacial prostheses and adjacent tissues and evaluation of the antimicrobial activity of different hygiene protocols and their effects on properties of two silicones. Ribeirão Preto, 2016. 189p. Thesis (PhD, Oral Rehabilitation). School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The aim of this clinical study was to identify clinically the microorganisms present in prostheses and adjacent tissues, evaluate laboratory antimicrobial action of different hygiene protocols on the main identified microorganisms and also evaluate the influence of hygiene protocols in color change, Shore A hardness, surface roughness and absorption of liquids, a new silicon (Bio-Skin) compared to the MDX 4-4210. For identification of microorganisms, 43 individuals with maxillofacial prostheses were submitted to harvesting the biofilm on the prosthesis and adjacent tissues and 38 targets species were surveyed through the Checkerboard DNA-DNA Hybridization method. The analysis of antimicrobial activity was conducted by formation of specific biofilm in six selected species. 288 specimens with pigmented makeup powder were fabricated with each material, and divided into groups for immersion in 0.12% chlorhexidine gluconate, *Ricinus communis* 10%, and brushing with neutral soap. As a control, one group was immersed in water. To analyze the influence of hygiene protocols on the properties of silicones, 120 circular specimens of each material were prepared (n = 10): no pigmentation (CG: control), with makeup powder (GP), opacifier (GO) or opacifier + makeup powder (GPO), and then be submitted to cleaning: EA (immersion in distilled + brushing water with neutral soap - control), ERc10% (immersion in *Ricinus solution communis* 10% + brushing with neutral soap) and EC10 12% (immersion in chlorhexidine gluconate 0.12% + brushing with neutral soap). The hygiene period simulated one year of clinical use. The quantitative response variables were measured immediately after obtaining the specimens and after the application of hygiene protocols and the variation obtained was used in the statistical analysis. For analysis of antimicrobial hygiene protocols and color change, Shore A hardness and surface roughness, there was analysis of variance and Tukey Supplementary test for comparison of averages. For the absorbing liquid, we applied the Kruskal-Wallis test. For comparing the count microorganisms present in prostheses and adjacents tissues we used the Wilcoxon test (Signed-rank Test). To analyze the data obtained by CFU counts for analysis of antimicrobial hygiene protocols, we used two-way ANOVA and Tukey Complementary Test. All analyzes were conducted with significance level of 5%. The method of Checkerboard DNA-DNA Hybridization indicated the presence of 38 species in the prostheses and adjacent tissue and the following microorganisms were selected: *C. glabrata*, *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. For antimicrobial

analysis, 0.12% chlorhexidine gluconate was the most effective, followed by mechanical brushing, against six species. The color change was not influenced by hygiene protocols and the slightest change was found with the Bio-Skin silicone GP and GPO groups. Silicone MDX showed less variation in Shore A hardness according to the maintenance protocol EC10,12%, while the hardness of Bio-Skin was not influenced by hygiene protocols. The variation in hardness between the two silicones were different only when subjected to ERc10% protocol. To the surface roughness, the MDX silicone showed the smallest variation of roughness. The percentage of absorption for the MDX 4-4210 silicone was not influenced by the pigment and sanitization protocols. For the Bio-Skin, the percentage of absorption was higher in GC and GO groups when subjected to EA protocol. Note that there was an interaction between pigment and maintenance protocol, where for silicone MDX, absorption was greater when subjected to EC10,12% protocol and Bio-Skin, there was a greater percentage absorption in the GC group and GO associated with brushing and immersion in water and GP groups and GPO associated with EC10,12% protocol. It was concluded that both prosthesis as adjacent tissues exhibit great amount of microorganisms colonizing and that daily hygiene are essential. The immersion in chlorhexidine gluconate 0.12% and mechanical brushing protocols with neutral soap have antimicrobial activity on the main microorganisms commonly present in prosthetics and tissue and silicone MDX 4-4210 had lower CFU counts compared to Bio Skin. Both materials showed variations due to different pigmentations and hygiene protocols, however, they were discreet and within acceptable clinical standards. Minor changes were observed when the materials were exposed to immersion protocols chlorhexidine gluconate 0.12% and brushing with neutral soap.

Keywords: Maxillofacial Prostheses, silicones, materials tests, microbiology, disinfection.

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução	33
2. Revisão de Literatura	39
2.1 Silicones para próteses faciais e suas características físico-mecânicas	41
2.2 Soluções higienizadoras (<i>Ricinus communis</i> e gluconato de clorexidina)	55
2.3 Técnicas moleculares de diagnóstico	60
3. Proposição	65
4. Material e Métodos	69
4.1 Identificação (in vivo) dos micro-organismos presentes em biofilme de próteses maxilofaciais e tecidos adjacentes, pelo método de hibridação de DNA Checkerboard	71
4.1.1 Seleção dos participantes	71
4.1.2 Coleta do biofilme Maxilofacial	72
4.1.3 Seleção dos micro-organismos alvos de detecção	72
4.1.4 Processamento das amostras pela técnica de hibridação de DNA Checkerboard	73
4.1.5 Confecção das sondas genômicas de DNA	73
4.1.6 Sensibilidade e especificidade das sondas marcadas	74
4.1.7 Processamento das amostras de biofilme coletadas dos participantes	74
4.1.8 Pré-hibridação das amostras	76
4.1.9 Aplicação das sondas de DNA e reações de hibridação	77
4.1.10 Lavagem da membrana	78
4.1.11 Detecção dos sinais de hibridação	78
4.1.12 Exposição da membrana e revelação	79
4.1.13 Interpretação dos sinais de hibridação	80
4.2 Avaliação do efeito de protocolos de higiene sobre a alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos de espécimes pigmentados, confeccionados com um silicone experimental e um silicone padrão para prótese	80
4.2.1 Delineamento experimental	80
4.2.2 Obtenção dos corpos de prova	81
4.2.3 Obtenção dos grupos com diferentes pigmentações	83
4.2.3.1 Obtenção do grupo controle (GC)	84
4.2.3.2 Obtenção do grupo pigmentado com pó de maquiagem (GP)	84
4.2.3.3 Obtenção do grupo pigmentado com opacificador (GO)	85
4.2.3.4 Obtenção do grupo pigmentado com pó de maquiagem associado ao opacificador (GPO)	85
4.2.4 Protocolos de higienização	86
4.2.5 Realização dos ensaios para mensuração das variáveis de resposta	88
4.2.5.1 Alteração de cor	88
4.2.5.2 Dureza Shore A	89
4.2.5.3 Rugosidade superficial	90
4.2.5.4 Absorção de líquidos	90
4.3 Avaliação da superfície dos corpos de prova de silicone após os protocolos de higiene, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	91

4.4 Avaliação laboratorial da ação antimicrobiana dos diferentes protocolos de higienização	91
4.4.1 Delineamento experimental	91
4.4.2 Obtenção dos corpos de prova e formação dos grupos de higienização	92
4.4.3 Esterilização dos corpos de prova	92
4.4.4 Meios de cultura utilizados	93
4.4.5 Padronização dos inóculos microbianos	95
4.4.6 Contaminação dos corpos de prova e formação do biofilme	96
4.4.7 Aplicação dos métodos de higienização	97
4.4.8 Semeadura em meio de cultura	99
4.5 Análise dos dados	101
5. Resultados	105
5.1 Identificação (in vivo) dos micro-organismos presentes em biofilme de próteses maxilofaciais e tecidos adjacentes, pelo método de hibridação de DNA Checkerboard	107
5.2 Avaliação do efeito de protocolos de higiene sobre a alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos	118
5.2.1 Alteração de cor	118
5.2.2 Dureza Shore A	119
5.2.3 Rugosidade Superficial	120
5.2.4 Absorção de líquidos	121
5.3 Avaliação da superfície dos corpos de prova de silicone após os protocolos de higiene, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	123
5.4 Avaliação laboratorial da ação antimicrobiana dos diferentes protocolos de higienização	135
6. Discussão	139
7. Conclusão	151
8. Referências Bibliográficas	155
9. Apêndice	169
10. Anexo	187

A Prótese Maxilofacial é uma especialidade odontológica que atua na região de cabeça e pescoço e tem como objetivo restaurar a estética e as funções perdidas ou alteradas por problemas congênitos, traumas ou onco-cirurgias (Azambuja *et al.*, 1994). As deformidades faciais, na maioria dos casos, são extensas e constrangedoras, podendo motivar problemas familiares, psicológicos e sociais aos pacientes (Goiato *et al.*, 2009).

Com o avanço da Medicina, a reconstrução cirúrgica plástica seria a primeira escolha de tratamento para reabilitação e reintegração social (Guiotti *et al.*, 2010). No entanto, ela pode ser contraindicada em situações de mutilações muito extensas ou tratamento radioterápico. Para estas, a reabilitação por meio de próteses maxilofaciais apresenta-se como uma opção para a reintegração social do paciente (Rezende, 1997; Schoen *et al.*, 2001; Goiato *et al.*, 2009), uma vez que são acessíveis, de baixo custo, não invasivas e podem contribuir para o restabelecimento funcional e estético (Allen *et al.*, 2000), contribuindo para a melhoria da qualidade de vida (Eleni *et al.*, 2011).

Diferentes materiais tais como madeira, marfim e metais foram utilizados ao longo do tempo na confecção de próteses maxilofaciais (Andrés *et al.*, 1992), sendo que os mais comumente empregados incluem a resina termicamente ativada e os silicones (Polyzois, 1999). Embora a resina acrílica apresente baixo custo, biocompatibilidade e propriedades mecânicas satisfatórias (Polyzois *et al.*, 2001; Karacaer *et al.*, 2003), próteses faciais confeccionadas em materiais rígidos não acompanham os movimentos musculares das zonas em que se produz a mímica facial e são de difícil adaptação sobre os tecidos que a circundam (Benoist, 1962).

Os silicones foram utilizados pela primeira vez em 1960, após a Segunda Guerra Mundial, por Barnharte (Kiat-Amnuay *et al.*, 2005). Apresentam como principal vantagem a melhor simulação dos tecidos perdidos (Guiotti *et al.*, 2010), uma vez que acompanham a movimentação muscular e aproximam-se da textura facial por tratar-se de um material borrachóide (Polyzois, 1999; Hatamleh *et al.*, 2011), o que clinicamente contribui para o conforto e adaptação dos pacientes (Allen *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2003; Guiotti *et al.*, 2010).

Bulbulian (1945) descreveu como material ideal para próteses maxilofaciais aquele que apresentasse biocompatibilidade, resistência mecânica, estabilidade de cor, flexibilidade, leveza, translucidez, baixa condutibilidade térmica, durabilidade, amoldabilidade, facilidade de duplicação, caracterização e facilidade de higiene. Dentre todas essas características do material restaurador, um aspecto importante a ser destacado para a escolha do mesmo relaciona-se à sua resposta frente à necessidade de higienização, pois tanto as lesões faciais

quanto as próteses nelas alojadas são passíveis de colonização microbiana (Kiat-Amnuay *et al.*, 2005; Kiat-Amnuay *et al.*, 2006).

As lesões maxilofaciais associadas aos dispositivos protéticos alteram a anatomia dos tecidos faciais e favorecem a colonização por micro-organismos (Morris-Jones *et al.*, 2002), uma vez que podem comprometer o equilíbrio natural da flora microbiana. Como consequência o paciente pode desenvolver dermatites e infecções (Morris-Jones *et al.*, 2002; Ariani *et al.*, 2012). Entretanto, a composição do biofilme responsável por tal ocorrência e sua relação com os materiais poliméricos ainda precisa ser estudado, principalmente no caso dos usuários de próteses faciais que, possivelmente, tem essa microbiota modificada em virtude da maior exposição ao meio ambiente, localização e amplitude das lesões (Morris-Jones *et al.*, 2002; Ariani *et al.*, 2012). Essa microbiota poderia ser identificada por meio de técnicas específicas, tais como o método de hibridação de DNA *Checkerboard*.

A higiene das próteses faciais em silicone é um procedimento delicado que, se realizada de forma inadequada, pode acelerar o processo de deterioração das mesmas (Kiat-Amnuay *et al.*, 2005; Kiat-Amnuay *et al.*, 2006; Goiato *et al.*, 2009; Goiato *et al.*, 2011). Levantamentos bibliográficos (Kiat-Amnuay *et al.*, 2002; Kiat-Amnuay *et al.*, 2006; Goiato *et al.*, 2009; Goiato *et al.*, 2011; Goiato *et al.*, 2012) apontam uma condição insatisfatória na higiene das próteses maxilofaciais, situação que pode estar associada à falta de orientação correta por parte dos cirurgiões dentistas, às características intrínsecas ao aparelho protético como rugosidade superficial excessiva (Goiato *et al.*, 2009), à diminuição da destreza manual dos pacientes (Dills *et al.*, 1988), ineficácia dos produtos disponíveis para essa função e, ainda, à falta de materiais específicos para a higienização de próteses maxilofaciais confeccionadas em silicone.

A limpeza da prótese, além de promover saúde aos tecidos adjacentes é importante para aumentar a longevidade das mesmas (Kiat-Amnuay *et al.*, 2006; Goiato *et al.*, 2011; Goiato *et al.*, 2012), contribuindo para a qualidade de vida dos pacientes. A escolha de um método de higiene deve ser baseada em critérios como facilidade de manuseio, efetividade na remoção de matéria orgânica, inorgânica e manchas, capacidade fungicida e bactericida, atoxicidade, compatibilidade com os materiais e baixo custo (Abere, 1979; de Andrade *et al.*, 2012). Métodos de higiene de próteses dentárias são amplamente utilizados e descritos na literatura (Felipucci *et al.*, 2011; de Andrade *et al.*, 2012; Pisani *et al.*, 2012; Segundo *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2014), no entanto, a maioria dos estudos direcionados às próteses maxilofaciais avaliam os efeitos dos mesmos somente sobre suas propriedades mecânicas (Kiat-Amnuat *et al.*, 2002; Kiat-Amnuat *et al.*, 2006; Goiato *et al.*, 2012; Eleni *et*

al., 2013a; Eleni *et al.*, 2013b; Eleni *et al.*, 2014), havendo ainda, a necessidade de avaliação antimicrobiana.

Após análise da bibliografia, verifica-se que dentre os métodos de higiene mais avaliados estão a clorexidina e peróxido alcalino (Kiat-Amnuat *et al.*, 2002; Goiato *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2011; Goiato *et al.*, 2011; Goiato *et al.*, 2012; Pesqueira *et al.*, 2012), micro-ondas, hipoclorito de sódio e solução desinfetante comercial chamada DARO B-200-09 (Eleni *et al.*, 2013a; Eleni *et al.*, 2013b) e os resultados indicam que tais soluções afetam propriedades importantes dos silicones tais como cor, dureza, rugosidade, estabilidade dimensional, resistência ao rasgamento, entre outras.

Alguns estudos têm avaliado uma solução a base de mamona como higienizadora de próteses totais. Análises já foram conduzidas para avaliação dos seus efeitos sobre propriedades de dentes artificiais em resina acrílica (Pisani *et al.*, 2012a), resina acrílica (Pisani *et al.*, 2010) e materiais resilientes para base de próteses totais e/ou parciais removíveis (Pisani *et al.*, 2012b; Segundo *et al.*, 2014), bem como para avaliação de sua ação antimicrobiana sobre o biofilme colonizador das próteses totais (Segundo *et al.*, 2014; de Andrade *et al.*, 2014). Os resultados indicam a possibilidade de aplicação clínica desta solução em função de seus resultados favoráveis quanto aos efeitos sobre os materiais das próteses e ação antimicrobiana. Sendo assim, estudos empregando a solução à base de mamona poderiam ser conduzidos com os elastômeros de silicone para próteses maxilofaciais. Independente da solução utilizada, a literatura relacionada à higiene de próteses indica a associação da imersão em solução química com a escovação, como forma eficaz de remoção do biofilme (Paranhos *et al.*, 2009).

Além dos aspectos de controle da colonização por micro-organismos, é importante atentar-se para a necessidade de avaliação das propriedades dos materiais empregados na confecção das próteses, uma vez que elas podem ser alteradas quando imersas em soluções de higiene (Moreno *et al.*, 2013; Pesqueira *et al.*, 2012).

Embora as propriedades dos materiais destinados à confecção de próteses faciais tenham melhorado consideravelmente (Kiat-Amnuat *et al.*, 2005), a instabilidade dos mesmos ainda limita o sucesso da reabilitação uma vez que propriedades como cor, dureza, rugosidade e absorção apresentam-se alteradas em curto período de tempo. Trabalhos mostram que o período para alteração de cor das próteses varia de 03 meses a um ano (Kiat-Amnuat *et al.*, 2005; Kiat-Amnuat *et al.*, 2010; Goiato *et al.*, 2011). Esta durabilidade limitada faz com que os pacientes retornem frequentemente ao serviço de atendimento para substituição de suas

próteses, gerando desgaste para o paciente e elevados custos para o serviço público (Ariani *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm sugerido que a adição de opacificadores podem proteger os silicões da degradação da cor e de outras propriedades mecânicas (Kiat-Amnuat *et al.*, 2002; Kiat-Amnuat *et al.*, 2005; Kiat-Amnuat *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2011), aumentando a durabilidade do material e mantendo a prótese esteticamente agradável por um período de tempo maior (Kiat-Amnuat *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011; Goiato *et al.*, 2011), proporcionando o desenvolvimento de uma nova classe de materiais que oferece, ao mesmo tempo, força, flexibilidade e resistência (Gasparro *et al.*, 1998; Frogley *et al.*, 2003; Goiato *et al.*, 2011).

Os opacificadores mais comumente empregados incluem o sulfato de bário, dióxido de titânio, pigmentos cerâmicos, pigmentos secos de titânio branco entre outros óxidos (Kiat-Amnuat *et al.*, 2005; Kiat-Amnuat *et al.*, 2006; Goiato *et al.*, 2009), entretanto, a adição desses componentes resulta em próteses com uma intensidade de cor muito forte (Kiat-Amnuat *et al.*, 2005), o que limita o seu uso clínico. Assim, uma possível associação entre opacificadores e agentes pigmentadores, tais como pó de maquiagem (Goiato *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011; Maida *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012) poderia ser sugerida e avaliada.

Como forma de buscar soluções para estes problemas, diversos estudos têm sido realizados com diferentes marcas comerciais, pigmentos e opacificadores, associados ou não a métodos de higiene e envelhecimento (Kiat-Amnuay *et al.*, 2002; Goiato *et al.*, 2009; Mancuso *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011; Maida *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012). Pinheiro *et al.* (2012) avaliaram o comportamento de um material experimental para Prótese Maxilofacial frente ao envelhecimento e pigmentação com pó de maquiagem. O silicone estudado é utilizado na ortopedia médica brasileira e apresenta boa elasticidade e resistência mecânica, baixo custo, facilidade de manuseio, acessibilidade e biocompatibilidade (Pinheiro *et al.*, 2011; Maida *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012). Os autores concluíram que, embora o material tenha apresentado estabilidade em propriedades como dureza e alteração de cor, o mesmo ainda precisa sofrer modificações estruturais para que possa ser considerado uma opção para reabilitações faciais.

Nesse sentido, a partir desses resultados prévios, uma nova formulação para aplicação em prótese facial foi obtida e a proposta do presente estudo foi avaliar suas propriedades frente a diferentes pigmentações e protocolos de higienização, bem como a atividade destes contra micro-organismos identificados em sítios protéticos e tecidos adjacentes.

Revisão de Literatura

Para obtenção de uma reabilitação facial protética satisfatória deve-se considerar diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar o conhecimento dos princípios de harmonia facial, mistura de cores, agentes pigmentadores, sistemas de ancoragem e retenção, peso da prótese e manutenção das propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais existentes no mercado. Além disso, para a longevidade da reabilitação, é muito importante a prática de hábitos de higiene eficazes e que não alterem os materiais protéticos (Goiato *et al.*, 2008).

Sendo assim, ao longo desta Revisão de Literatura, serão apresentados aspectos importantes em relação aos materiais reabilitadores faciais mais comumente utilizados nas reabilitações faciais, bem como métodos de higienização, micro-organismos constituintes do biofilme facial e técnicas moleculares de diagnóstico.

1. Silicones para próteses faciais e suas características físicas, químicas e mecânicas

O uso de silicones na Medicina iniciou-se a partir de 1953 e Barnhart (1960) foi o primeiro a utilizá-lo odontologicamente, na construção de Próteses Maxilofaciais, obtendo flexibilidade e excelente tolerabilidade pelo organismo, tornando-se o material de escolha até os dias atuais. Por definição, são polímeros compostos de moléculas de alto peso molecular que consistem em uma repetição de unidades básicas que formam longas cadeias cíclicas (Bell *et al.*, 1985). Podem ser classificados, segundo a sua forma de polimerização, em silicones do tipo HTV, que são os vulcanizados pelo calor, e do tipo RTV, que são os vulcanizados à temperatura ambiente (Bell *et al.*, 1985). São bem tolerados pela mucosa e pele, flexíveis e não condutores de calor. O HTV é mais durável e resistente, porém apresenta uma técnica de manipulação mais sofisticada (Bell *et al.*, 1985; Hatamleh *et al.*, 2011).

Craig *et al.* (1978) avaliaram a estabilidade de cor em condições de envelhecimento acelerado de elastômeros para próteses maxilofaciais disponíveis comercialmente. Diferentes categorias de materiais foram avaliadas, sendo um cloreto de polivinil plastificado (Prototype III), um poliuretano (Epithane) e quatro silicones, três polimerizados a temperatura ambiente (Silastic 382, Silastic 399 e Silastic 44210) e um polimerizado pelo calor (Silastic 44515). Cinco espécimes de cada material foram avaliados por espectrofotometria de refletância e submetidos a envelhecimento artificial (100, 300, 600 e 900 horas). O protocolo de envelhecimento do poliuretano foi interrompido após 300 horas devido a uma grave deterioração. Segundo os autores, o cloreto de polivinil apresentou-se ligeiramente amarelo após processamento e tornou-se mais claro após 100 horas de envelhecimento. O poliuretano apresentou ligeiro aumento em sua intensidade de cor, no entanto, o principal problema foi a

severa degradação após 300 horas de envelhecimento. O Silastic 44210 apresentou os melhores resultados. Os autores concluíram que a seleção do silicone depende da tonalidade de cor desejada, da estabilidade de suas propriedades e se a polimerização pelo calor ou pela temperatura ambiente é desejada.

Craig, Koran e Yu (1978) publicaram uma revisão de literatura abordando diferentes estudos científicos que avaliaram elastômeros de silicone para aplicação em Prótese Maxilofacial. Os autores concluíram que informações adicionais sobre características dos tecidos humanos podem contribuir para obtenção de propriedades elásticas e viscoelásticas dos materiais. A aplicação desta informação deve resultar em melhor estética após caracterização definitiva da prótese com uma considerável economia de tempo. Outra área que deve receber atenção é o estudo de adesivos e seus efeitos sobre os tecidos e os materiais maxilofaciais. Os autores consideraram o elastômero 4-4210 um exemplo comercial, uma vez que o material oferece ótimas propriedades gerais.

Bell, Chalian e Moore (1985) avaliaram as propriedades físicas e mecânicas de diferentes silicones (MDX4-4515, Q7-4635, Q7-4650, Q7-4735 e SE452JU) e compararam os resultados com os de estudo prévio realizado com Silastic MDX4-4210 e MDX4-4514, visando encontrar materiais alternativos para uso em reabilitações Maxilofaciais. As propriedades avaliadas foram resistência à tração, alongamento, resistência ao rasgamento e dureza. Os resultados de resistência à tração indicaram diferenças significativas entre todos os materiais testados, com exceção do MDX4-4515 e Q7-4635. Todos os materiais avaliados apresentaram valores satisfatórios resistência à tração. Resultados de resistência ao rasgamento revelaram diferenças significativas entre todos os materiais, exceto Q7-4635 e SE4525U. Com exceção do MDX4-4515, todas as amostras apresentaram maior alongamento do que os materiais previamente testados. A análise de dureza não revelou diferença significativa entre MDX4-4515, Q7-4650, SE4524U, Q7-4635 e Q7-4735. Embora os silicones testados tenham apresentado propriedades com valores dentro de um intervalo de aceitabilidade clínica, o Silastic MDX4-4210 e MDX4-4514 exibiram um maior grau de maciez. Em geral, as propriedades físicas dos materiais testados neste estudo foram superiores às dos materiais testados previamente (Silastic MDX4-4210 e MDX4-4514). Essa superioridade foi particularmente evidente em termos de resistência e alongamento. Embora nenhum material tenha sido consistentemente superior aos dois silicones de comparação, os melhores resultados foram obtidos com os silicones Q7-4635 e SE4524U, que apresentaram alta resistência e maciez, características desejáveis no momento da escolha de um material reabilitador que necessita simular os tecidos faciais.

Carl *et al.* (1992) realizaram um levantamento com o objetivo de identificar os materiais usados com maior frequência por especialistas na confecção de próteses maxilofaciais. A pesquisa abordou informações relativas a vantagens e desvantagens dos materiais utilizados, métodos para caracterização das próteses e quais seriam as características ideais de um material. Os resultados indicaram que a maioria dos profissionais que atuam na especialidade prefere trabalhar com os silicones do tipo RTV, que são os polimerizados a temperatura ambiente, associados à caracterização do tipo intrínseca, com pigmentos vegetais secos e pigmentos utilizados por artistas plásticos. Os autores concluíram também que há necessidade de pesquisas adicionais, visando o desenvolvimento de novos materiais bem como a melhoria dos já existentes, visto que não há disponível no mercado um material que possa ser considerado ideal para a especialidade.

Polyzois *et al.* (1994) avaliaram propriedades mecânicas e a biocompatibilidade de três elastômeros de silicone, sendo dois deles polimerizados em temperatura ambiente (silicone A-2186 e silicone 71556) e um polimerizado pelo calor (Mollomed). As propriedades mecânicas avaliadas foram dureza Shore A, resistência à tração, alongamento percentual, deformação permanente e resistência ao rasgamento e a biocompatibilidade foi avaliada pelo potencial de citotoxicidade por meio do teste de sobreposição de agarose. Tais propriedades foram escolhidas e testadas devido à sua relevância clínica na confecção de próteses faciais. Os autores concluíram que o silicone A-2186 apresentou uma melhor combinação de elevada resistência ao rasgamento e alongamento percentual quando comparado aos silicones Mollomed e 71556, que, por sua vez, mostrou ser o material mais fraco dentre os três silicones comparados. Todos os materiais avaliados demonstraram ausência de citotoxicidade nos testes de cultura celular. Para as demais propriedades não houve diferença significativa entre os materiais avaliados.

Saboya *et al.* (1997) realizaram um estudo com o objetivo de encontrar um silicone no comércio nacional brasileiro que pudesse ser indicado para confecção de Próteses Maxilofaciais e pudesse ser adquirido no comércio nacional brasileiro. Três marcas comerciais de silicones acéticos (Silastic 732, Rhodiastic 151 e TH 213) foram avaliadas isoladamente e em adição ao silicone MDX4-4210. As variáveis foram dureza Shore A e resistência ao rasgamento. As misturas individuais de cada um dos silicones acéticos com o silicone MDX4-4210 foram feitas nas seguintes proporções em volume: 75% de silicone acético e 25% de MDX 4-4210; 50% de silicone acético e 50% de MDX 4-4210; 25% de silicone acético e 75% de MDX 4-4210. Os materiais foram manipulados segundo instruções dos fabricantes, sendo confeccionados quatro espécimes para cada um dos quatro silicones em

estado original e quatro para cada uma das três misturas dos silicones acéticos com o MDX 4-4210. Os autores concluíram que os silicones acéticos estudados, em estado original, apresentaram comportamentos semelhantes entre si e próximo ao do silicone MDX4-4210, que é um material padrão ouro muito utilizado nos estudos científicos. Os silicones acéticos misturados ao MDX4-4210, na proporção de 75% e 50%, apresentaram redução na dureza Shore A e na resistência ao rasgamento, contudo, existe a possibilidade da sua utilização em próteses faciais quando a resistência não for essencial. Por fim, os silicones acéticos misturados na proporção de 25% ao MDX 4-4210 apresentaram resistência e dureza Shore A muito baixa, o que contraindica o seu uso em Próteses Maxilofaciais.

Polyzois *et al.* (1998) investigaram propriedades físicas (alteração de cor), mecânicas (percentual de alongamento, resistência ao rasgamento e dureza Shore A) e citotoxicidade (teste de difusão em agarose) de dois silicones protéticos (Ideal e Silskin 2000), polimerizados em temperatura ambiente, quando comparado a um material padrão ouro (Elastosil M 3500). Os autores concluíram que o silicone Elastosil M 3500 tem uma melhor combinação de alta resistência ao rasgamento, estabilidade de cor e percentual de alongamento. Os silicones Ideal e Silskin 2000 apresentaram valores de dureza Shore A muito abaixo do recomendado pela literatura. Concluíram também que todos os silicones avaliados apresentaram baixa citotoxicidade.

Próteses Maxilofaciais geralmente são confeccionadas a partir de moldes de gesso do tipo pedra e, geralmente, os estudos científicos avaliam as propriedades mecânicas de silicones maxilofaciais por meio de corpos de prova confeccionados a partir de matrizes metálicas. Por isso, Lai *et al.* (1999) compararam as propriedades mecânicas do silicone A-2186 quando confeccionado em moldes de aço inoxidável ou de gesso buscando verificar se a polimerização do silicone pode ser inibida ou prejudicada por impurezas frequentemente encontradas nos moldes de gesso e também na presença de aditivos (pigmentos, opacificador e fibra). As propriedades avaliadas foram dureza Shore A, resistência à tração, resistência ao rasgamento e percentual de alongamento. Os autores concluíram que as propriedades mecânicas avaliadas foram significativamente mais elevadas para os espécimes confeccionados a partir de matrizes de aço inoxidável e que os aditivos, nas proporções utilizadas no estudo, reduziram valores de dureza Shore A, resistência à tração, resistência ao rasgamento e percentual de alongamento do silicone avaliado. A utilização de moldes em gesso pedra na fabricação de Próteses Maxilofaciais pode degradar a prótese quando confeccionada com o silicone A-2186, possivelmente pela presença de impurezas que inibem a polimerização do material, produzindo próteses de qualidade inferior.

Para simular a exposição das próteses faciais aos produtos resultantes da transpiração, Polyzois *et al.* (2000) imergiu o silicone Episil em um simulador de sebo e suor por seis meses a temperatura de 37°C. As variáveis de resposta foram resistência à tração, alongamento, resistência ao rasgamento, dureza Shore A, alteração de peso e alteração de cor, as quais foram mensuradas uma semana após a confecção dos corpos de prova e ao final dos seis meses. A variação dos valores obtidos neste período foi utilizada na análise estatística, exceto para a alteração de peso, que foi analisada 5, 15, 30 e 180 (final) dias após a confecção dos espécimes. Os autores concluíram que a alteração de cor (ΔE) variou de 2,03 (baseline) a 3,53 (após seis meses) enquanto que a dureza Shore A variou entre 24 e 29,9. As amostras imersas em solução aquosa apresentaram aumento de peso e, ao contrário, as imersas em solução de sebo apresentaram perda de peso, provavelmente por causa da extração de algum componente do silicone. Entretanto, as demais propriedades analisadas apresentaram alterações mínimas, o que não contra indica o silicone avaliado quando sujeito às condições experimentais semelhantes ao presente estudo.

Lai *et al.* (2002) compararam as propriedades físicas de um novo material protético baseado em polidimetilsiloxano, com cadeia terminada em metacrilasopropil (MPDS-MF), com o silicone A-2186. O silicone A-2186 é um material protético amplamente utilizado, entretanto, possui uma fraca aderência a adesivos a base de silicone devido sua natureza hidrofóbica. Foram avaliadas as propriedades de dureza, resistência à tração, alongamento, resistência ao rasgamento e resistência de união adesiva dos silicones MPDS-MF e A-2186, com e sem aditivos. Os resultados mostraram que a dureza do MPDS-MF foi similar à do A-2186, entretanto, a resistência à tração, alongamento, resistência ao rasgamento e resistência de união adesiva do MPDS-MF foram superiores às do silicone A-2186. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato do MPDS-MF possuir um longo tempo de trabalho, desde sua manipulação até a polimerização final, além do fato da presença de grupos metacrilato aumentar a força de adesão, sendo, portanto, este material um silicone adequado para confecção clínica de próteses faciais.

Aziz *et al.* (2003) avaliaram as propriedades de uma série de materiais à base de silicone com indicação para reabilitações maxilofaciais disponíveis no mercado, visando propor recomendações para possíveis melhorias. Os silicones estudados foram: Cosmesil, Cosmesil HC, Factor II, Prestige e Nusil e os espécimes foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. As propriedades avaliadas foram resistência ao rasgamento, resistência à tração, percentual de alongamento, dureza, absorção de água e hidrofobicidade. Os autores concluíram que a resistência ao rasgamento dos silicones Factor II, Cosmesil St e

Cosmesil HC foi semelhante e significativamente maior do que os silicones Cosmesil St e Prestige. Não houve diferença significativa ($p=0,05$) na dureza do Cosmesil St e HC Cosmesil e ambos foram significativamente mais duros ($p=0,001$) que o Factor II, Prestige e Nusil. Os autores concluíram ainda que nenhum dos materiais avaliados possui propriedades ideais para o uso clínico em reabilitações maxilofaciais. O silicone Factor II foi o único que apresentou propriedades mais favoráveis como alta resistência ao rasgamento, suavidade (baixos valores de Dureza Shore A) e facilidade de manipulação.

Guiotti *et al.* (2003) avaliaram o efeito do tempo de exposição ao meio ambiente e da adição de pigmentos, sobre a estabilidade dimensional e a manutenção de detalhes de dois silicones para uso facial (Brascoved e Silastic 732 RTV). Os espécimes foram distribuídos em três grupos para cada silicone utilizado: controle (incolor), pigmentação com maquiagem ou com óxido de ferro. Para a análise da alteração dimensional foi empregado microscópio comparador e para a análise da reprodução de detalhes, lupa estereoscópica. As leituras foram realizadas imediatamente, 30 e 60 dias após a polimerização dos corpos de prova. Os dados foram analisados pelo Teste ANOVA e Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Os dois silicones apresentaram contração; o fator tempo influenciou estatisticamente a estabilidade dimensional do Silastic, após 60 dias, em todos os grupos; para o Brascoved, o fator tempo influenciou em todos os períodos e em todos os grupos. O uso de pigmentos contribuiu para a melhor estabilidade dimensional do Silastic, quando comparado com o grupo incolor. Para o Brascoved, o grupo pigmentado com óxido de ferro sofreu o maior grau de contração. Os detalhes foram mantidos para ambos os silicones. Os autores concluíram que, frente aos fatores estudados, o silicone Silastic 732 RTV é um bom material para prótese facial, não sendo afetado significativamente pelo tempo de exposição ao meio ambiente e que a pigmentação melhora o seu comportamento.

Karayazgan, Gunay e Evlioglu (2003) avaliaram o uso de reforços de sílica (tule) em silicones para confecção de próteses faciais, visando o aumento da resistência ao rasgamento. O silicone avaliado foi reforçado com frações crescentes de sílica, até 35%. Os autores observaram que com o aumento no volume de sílica, houve aumento considerável da resistência ao rasgamento, concluindo que a incorporação de reforço aos materiais de confecção de próteses faciais resulta em margens mais estáveis, mais resistentes ao rasgamento, podendo diminuir a possibilidade de deformação quando da aplicação de adesivos, cosméticos ou agentes de limpeza.

Goiato *et al.* (2004) analisaram o efeito da pigmentação e da desinfecção química sobre a recuperação elástica e a resistência ao rasgamento de um silicone para uso em prótese

facial. Para mensuração das variáveis, dez amostras foram pigmentadas com pó de maquiagem, dez com óxido de ferro e dez foram confeccionadas sem pigmentação. Cinco amostras de cada grupo foram expostas à desinfecção com clorexidina a 2% por aspersão. Nos intervalos de desinfecção, as amostras foram imersas em soro fisiológico e armazenadas em uma estufa a $35^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. As amostras foram submetidas aos ensaios de rasgamento, em máquina de ensaio universal (EMIC); e de recuperação elástica, em relógio indicador, após 60 dias. Os dados foram analisados por meio do Teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). As amostras pigmentadas com pó de maquiagem, com e sem desinfecção, apresentaram médias mais altas de resistência ao rasgamento. A desinfecção química diminuiu os valores da recuperação elástica independente da pigmentação ($p < 0,5$). Os autores concluíram que o silicone pigmentado com pó de maquiagem apresenta propriedades físicas satisfatórias para uso em prótese maxilofacial.

Mancuso *et al.* (2005) publicaram uma revisão de literatura avaliando a alteração da cor de diversos materiais utilizados em próteses maxilofaciais em função da pigmentação e do envelhecimento. Dentre os materiais estudados, o silicone Silastic MDX4-4210 apresentou os melhores resultados de estabilidade de cor, sendo considerado como um material que se aproxima bastante do ideal. Dentre os diferentes tipos de pigmentação, a pigmentação intrínseca resultou em menor alteração de cor bem como o envelhecimento ao ar livre quando comparado ao envelhecimento acelerado. Segundo os autores, novas pesquisas sobre as propriedades dos materiais são necessárias em função da diversidade de materiais e pigmentos disponíveis nos diferentes países e da falta de padronização dos ensaios.

Eleni *et al.* (2007) avaliaram quatro biomateriais sintetizados industrialmente (Episil Europe 1, Europa 2, Europa 3 e África 3) quando expostos à radiação solar (UVA, UVB) por oito diferentes períodos de tempo (8-168 h). Danos estruturais devido a exposição à irradiação foram investigados por ensaios mecânicos de compressão e análise térmica de calorimetria exploratória (DSC). Modelos matemáticos simples foram desenvolvidos, contendo parâmetros com significado físico para o teste de compressão como: máximo stress (r_{max}), máxima deformação (e), parâmetro de elasticidade (E), parâmetro de viscoelasticidade (p). Para o DSC foi utilizada a temperatura de fusão (T_m) e entalpia em ponto de fusão (calor). Com o aumento do tempo de irradiação, os valores de estresse e tensão máximos diminuíram significativamente, bem como houve diminuição da elasticidade e estabilidade molecular. Diminuição nos pontos de fusão e aquecimento também foi observada em função do tempo de irradiação crescente. Os autores concluíram que a radiação solar influenciou negativamente a estabilidade estrutural dos biomateriais examinados.

Gunay *et al.* (2008) investigaram o efeito da incorporação de um reforço de tule sobre as propriedades mecânicas do elastômero de silicone A-2186. Foram obtidos 20 espécimes do silicone com tule incorporado em sua massa durante manipulação e 20 sem tule, os quais formaram o grupo controle. As propriedades analisadas foram resistência ao alongamento por tensão e resistência ao rasgamento. Os dados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney com significância estatística ao nível 5%. As forças de alongamento e de rasgamento nos espécimes com incorporação de tule foram maiores se comparadas às do grupo controle ($p < 0,05$), sugerindo que a incorporação de tule reforçou o silicone avaliado, resultando em melhores propriedades mecânicas.

Guiotti *et al.* (2008) avaliaram a influência do tempo de armazenagem, desinfecção diária e dois tipos de pigmentação sobre a deterioração marginal e a dureza Shore A de um silicone nacional para uso em prótese facial (Silastic 732 RTV). Trinta corpos de prova foram divididos em 3 grupos: incolor, pigmentados com pó de maquiagem ou com óxido de ferro. A análise da deterioração marginal foi realizada em microscópio eletrônico de varredura e o ensaio de dureza foi realizado em durômetro Shore A, imediatamente (*Baseline*), seis meses e um ano após a confecção dos espécimes. Os resultados indicaram que o silicone Silastic 732 RTV apresentou um aumento em sua dureza Shore A com o passar do tempo, apresentando diferença estatisticamente significativa entre o *baseline* e após seis meses, entretanto, apesar da variação, os valores de dureza mantiveram-se de acordo com os encontrados na literatura, independentemente do tempo de armazenagem, da pigmentação e da desinfecção química. Após a análise das imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura foi possível perceber que todos os grupos sofreram deterioração marginal com o passar do tempo e que a desinfecção química não contribuiu para a deterioração marginal do silicone, independentemente do tipo de pigmentação.

Han *et al.* (2010) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, ou 3,0% em peso) de óxidos nanométricos (Ti, Zn, ou Ce) nas propriedades mecânicas do A-2186, elastômero de silicone comumente usado para a fabricação de próteses maxilofaciais. Espécimes do silicone sem a adição dos óxidos serviram como grupo controle. A resistência à tração (ASTM D142) e a resistência ao rasgamento (ASTM D 624) foram avaliadas em uma máquina universal de ensaios. A uniformidade da dispersão das partículas nanométricas na massa do silicone foi avaliada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Os dados foram analisados por teste ANOVA (*two-way*) e para análise das comparações foi utilizado o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicou que os três óxidos se distribuíram uniformemente em

todos os espécimes, exceto nas concentrações de 3,0%, onde permaneceram parcialmente aglomerados. Todos os óxidos nas concentrações de 2,0% e 2,5% promoveram valores de tração e resistência ao rasgamento significativamente mais altos ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle. O óxido de CeO_2 apresentou resistência à tração significativamente menor do que TiO_2 e ZnO ($p < 0,05$). O grupo com ZnO apresentou resistência significativamente maior do que os grupos com TiO_2 e CeO_2 ($p < 0,05$). De modo geral, a incorporação de nano-óxidos com concentrações de 2,0% e 2,5% de Ti, Zn, ou Ce promoveram melhora nas propriedades mecânicas do silicone A-2186.

Mancuso *et al.* (2009) avaliaram a estabilidade de cor de dois tipos de silicones, um acético e um específico para prótese facial, em função da pigmentação. Vinte e quatro amostras de cada material foram distribuídas em quatro grupos: incolor; pigmentados com cerâmica, cosméticos ou óxido de ferro e submetidos a envelhecimento acelerado. As leituras de cor foram realizadas em espectrofotômetro após a obtenção dos espécimes e após 163, 351, 692 e 1.000 horas de envelhecimento. A análise dos dados indicou que, independentemente do período de tempo analisado, os materiais apresentaram alteração cromática. Os espécimes de Silastic 732 e MDX 4- 4210, sem pigmentação, apresentaram os menores valores de alteração de cor após 1000 horas de envelhecimento. Os silicones com pigmento cerâmico apresentaram menor alteração de cor, quando comparado ao pó de maquiagem. Os materiais sem a incorporação de pigmentos apresentaram valores similares de alteração de cor. O pó cosmético foi o pigmento que promoveu a maior alteração.

Goiato *et al.* (2009) avaliaram a dureza Shore A e rugosidade superficial de dois silicones para prótese Maxilofacial após desinfecção química e armazenamento. Vinte e oito espécimes foram divididos em quatro grupos, sendo G1 - Silastic MDX4-4210 desinfetado com comprimidos efervescentes; G2 - Silastic MDX4-4210 desinfetado com sabão neutro; G3 - Silastic 732 RTV desinfetado com comprimidos efervescentes; G4 - Silastic 732 RTV desinfetado com sabão neutro. Após observação dos dados, os autores concluíram que o tempo de armazenamento influenciou na dureza e rugosidade dos materiais, sendo que o silicone MDX4-4210 apresentou valores mais elevados do que o Silastic 732 RTV, em ambas as propriedades. Nenhum dos métodos de desinfecção testados promoveu alteração significativa nas propriedades dos materiais.

Montgomery e Kiat-Amnuay (2010) analisaram materiais atualmente utilizados para confecção de próteses maxilofaciais bem como as suas vantagens e desvantagens, tendo como objetivos reforçar o conhecimento científico, gerar ideias de pesquisa e, possivelmente, incentivar a produção de novos materiais. Um questionário com 47 questões foram entregues,

via e-mail, a 260 membros da Associação Americana de Anaplastologia (AAA) e Academia Americana de Próteses Maxilofaciais (AAPM), para avaliação das preferências pessoais envolvendo os materiais protéticos em relação ao tipo de pigmentação (intrínseca ou extrínseca), tipo de pigmento, processo de polimerização, vantagens e desvantagens do material mais frequentemente utilizado, característica mais importante do material e técnica utilizada. 43 participantes (16%) indicaram que o material mais comumente utilizado é silicone vulcanizado à temperatura ambiente (RTV). Pigmentos de silicone para pigmentação intrínseca e pastas de silicone para pigmentação extrínseca foram mais indicados que os pigmentos à base de óleo ou pigmentos de terra seca. O processo de polimerização e/ou tempo de cura e temperatura para o mesmo material variou entre os usuários. As cinco principais vantagens dos materiais mais frequentemente utilizados foram boa estética, facilidade de coloração e manipulação, produção de margens finas e compatibilidade com adesivos. As cinco principais desvantagens citadas foram: descoloração, sensibilidade da técnica, dificuldade de reparo, falta de corantes extrínsecos e baixa longevidade. Materiais não tóxicos e não alérgicos, com alta resistência e estabilidade de cor foram às características mais importantes na escolha de um material protético. As respostas obtidas neste estudo indicam que a maioria dos membros da AAA e AAPM usa ou usou uma variedade de silicones RTV, pigmentos e corantes que contribuem para melhores resultados possível na confecção de próteses faciais. Outras pesquisas são necessárias para aperfeiçoar e melhorar os materiais para a confecção dessas próteses.

Segundo Guiotti *et al.* (2010), as maiores falhas das próteses faciais são causadas pelas limitações nas propriedades dos materiais existentes, especialmente a flexibilidade e durabilidade. Neste estudo, os autores avaliaram a dureza Shore A do silicone Silastic MDX4-4210 em função do período de estocagem, desinfecção diária e dois tipos de pigmentação. Trinta espécimes foram distribuídos em três grupos: sem pigmentação, pigmentados com maquiagem ou pigmentados com óxido de ferro. A dureza Shore A foi mensurada imediatamente, seis meses e um anos após a obtenção dos espécimes. Os valores de dureza foram analisados por Teste Anova e Tukey ($p < 0,05$). O silicone apresentou aumento da dureza com o tempo, sendo que se estabilizou entre seis meses e um ano. O silicone avaliado apresentou valores de dureza Shore A dentro dos padrões relatados na literatura, independentemente do período de armazenagem, pigmentação e desinfecção química.

Goiato *et al.* (2010) avaliaram os efeitos dos opacificadores sulfato de bário e dióxido de titânio sobre a dureza do silicone Silastic MDX4-4210, após desinfecção química e envelhecimento acelerado. Noventa espécimes foram divididos aleatoriamente em três grupos

(n=30) de pigmentação (ausência de opacificador, pigmentado com sulfato de bário a 0,2% ou pigmentado com dióxido de titânio a 0,2%) e, ainda, as amostras foram desinfetadas três vezes por semana, durante sessenta dias consecutivos com as seguintes soluções: Efferdent, sabão neutro e gluconato de clorexidina a 4%. Finalizado o período de desinfecção, o envelhecimento acelerado foi realizado. As leituras de dureza foram feitas imediatamente após a obtenção dos espécimes (*baseline*), após o protocolo de desinfecção e após 252, 504 e 1008 horas de envelhecimento. Os grupos pigmentados com sulfato de bário e sem pigmento apresentaram aumento da dureza ao longo do experimento enquanto o grupo pigmentado com dióxido de titânio apresentou redução significativa da dureza após a desinfecção e 252 horas de envelhecimento acelerado, exceto para as amostras desinfetadas com clorexidina. Após 1.008 horas de envelhecimento, a dureza das amostras pigmentadas com dióxido de titânio aumentou independente do agente desinfetante utilizado. Após 60 dias de desinfecção com Efferdent, os grupos pigmentados com opacificador apresentaram valores de dureza inferiores ao grupo sem pigmentação. Os autores concluíram que a desinfecção química e o envelhecimento acelerado não influenciaram estatisticamente na dureza do grupo sem pigmentação, mas quando o opacificador foi adicionado, tanto a desinfecção quanto o envelhecimento acelerado influenciaram a dureza, porém as alterações encontradas foram aceitáveis, considerando os parâmetros de dureza encontrados na literatura.

Hatamleh e Watts (2011) investigaram a porcentagem de alongamento, módulo de elasticidade, dureza e força de união (por cisalhamento) de elastômeros de silicone (TechSil S25, Cosmesil M511 e Cosmesil Z004) a um substrato de resina acrílica. Os dados foram analisados com teste Anova, Bonferroni e Dunnett's T3 ($p<0,05$). A força de união e a porcentagem de alongamento do S25 foram maiores que a do M511 e Z004 ($p<0,05$). Z004 e S25 tornaram-se mais rígidos que o M511 ($p<0,05$). Os materiais apresentaram resistência ao rasgamento e módulos de elasticidade semelhantes ($p>0,05$). Z004 apresentou maior resistência ao rasgamento se comparado ao S25 ($p<0,05$). Houve uma correlação linear positiva entre a resistência ao rasgamento, resistência ao cisalhamento e dureza Shore A ($r=0,717$). Os autores concluíram que todos os materiais apresentaram propriedades desejáveis, sendo que o TechSil S25 apresentou a melhor combinação entre resistência à tração, alongamento, resistência ao rasgamento e dureza, entretanto, Cosmesil Z004 foi mais resistente ao cisalhamento.

Haddad *et al.* (2011) investigaram a estabilidade dimensional e reprodução de detalhes de um silicone (Silastic MDX4-4210) frente à pigmentação e desinfecção. 120 amostras foram divididas aleatoriamente em 12 grupos (n=10) de acordo com a pigmentação e o

método de desinfecção (nenhum pigmento, pó cerâmico, sulfato de bário, pó cerâmico e sulfato de bário, desinfecção com sabão neutro, Efferdent ou clorexidina 2%). A estabilidade dimensional e os testes de reprodução de detalhes foram realizados inicialmente, após 60 dias de desinfecção, e após diferentes tempos de envelhecimento acelerado (252, 504, e 1008 horas). Os protocolos de desinfecção e envelhecimento acelerado simularam um período de um ano de uso clínico. Todos os grupos avaliados apresentaram alterações dimensionais ao longo do experimento. A incorporação de pigmento cerâmico e/ou opacificador alterou a estabilidade dimensional dos espécimes avaliados, mas não apresentou influência significativa na reprodução de detalhes. Os autores concluíram que os desinfetantes avaliados não promoveram alterações estatisticamente significativas na estabilidade dimensional e reprodução de detalhes do silicone MDX4-4210 e o envelhecimento acelerado foi responsável pela maioria das alterações dimensionais encontradas, porém todas elas mantiveram-se dentro dos limites de estabilidade necessários para esta aplicação.

Segundo Eleni *et al.* (2013) a desinfecção diária das Próteses Maxilofaciais pode reduzir sua vida útil e causar a necessidade de substituição precoce. Assim, os autores avaliaram possíveis alterações no comportamento mecânico (resistência à tração em diferentes parâmetros e micro dureza em várias profundidades) de dois elastômeros maxilofaciais, sendo um experimental (polietileno clorado - CPE) e um comercial (polidimetilsiloxano - PDMS), após quatro diferentes regimes de desinfecção (energia de micro-ondas, imersão em hipoclorito de sódio 1%, escovação com sabão neutro e imersão em solução antimicrobiana comercial - DARO B-200-09). Os regimes de desinfecção simularam um ano de uso clínico. A maioria dos parâmetros de tração apresentou alterações significativas entre os diferentes protocolos de desinfecção e materiais, sendo a energia de micro-ondas responsável pelas maiores alterações, em ambos os silicones. Os autores concluíram que, para os silicones avaliados, a exposição em energia de micro-ondas não é a melhor opção para a desinfecção, sendo o agente microbiano comercial e a escovação com sabão neutro os mais apropriados.

Eleni *et al.* (2013) avaliaram a dureza Shore A e a alteração de cor de dois silicones maxilofaciais (polietileno experimental - CPE e polidimetilsiloxano comercial - PDMS) quanto submetidos a quatro diferentes protocolos de desinfecção (energia de micro-ondas, imersão em hipoclorito de sódio, escovação com sabão neutro e escovação com sabão desinfetante comercial). Os resultados indicaram alterações significativas na cor e dureza dos materiais após os diferentes regimes de desinfecção. As alterações na cor foram clinicamente inaceitáveis na maioria dos casos, com valores (ΔE) que variaram de 1,51 – 4,15 e 1,54 – 5,92

para os silicones PDMS e CPE, respectivamente. Houve diminuição na dureza do silicone PDMS após todos os regimes de desinfecção. O silicone CPE apresentou diminuição na dureza após desinfecção com hipoclorito de sódio e sabão neutro e aumento após exposição à energia de micro-ondas e imersão com o agente microbiano comercial. O silicone PDMS apresentou as maiores alterações na cor e dureza após desinfecção com hipoclorito de sódio, o que nos leva a concluir que para este material o procedimento mais adequado de desinfecção é a exposição à energia de micro-ondas e o menos recomendado é a imersão em hipoclorito de sódio. Já para o silicone CPE, sugere-se desinfecção com solução de hipoclorito de sódio e não se recomenda o uso de sabão neutro. Comparando os dois materiais, o silicone PDMS parece apresentar maior estabilidade de cor, enquanto o CPE possui menores alterações na dureza.

Polyzois *et al.* (2014) avaliaram o efeito de um ano de armazenamento no escuro (ausência total de luz) na dureza Shore A de dois silicones protéticos (Premium e Silasto 30). A dureza foi mensurada imediatamente após a confecção dos espécimes (*baseline*) e semanalmente, por 12 meses consecutivos. A dureza dos silicones Premium e Silasto 30 variou entre 16,9 – 26,0 e 32,0 – 36,3, respectivamente, sendo possível concluir que os elastômeros mostraram uma tendência de aumento na propriedade ao longo dos 12 meses. Para o silicone Premium, o aumento na dureza Shore A atingiu um valor crescente a partir do sexto mês, enquanto que para o silicone Silasto 30, os valores mantiveram-se constantes.

Eleni *et al.* (2014) avaliaram as alterações de um silicone experimental (polietileno clorado – CPE) comparado a um silicone comercial (Polydimethyl – PDMS), quando submetidos à simulação de um ano de uso clínico a diferentes regimes de desinfecção. Os regimes de desinfecção foram: exposição à energia de micro-ondas, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1%, escovação com sabão neutro e imersão em uma solução de desinfecção comercial (DARO B-200-09). Um quinto grupo foi mantido em ambiente escuro, como controle. Ensaio de análise termo dinâmica e operados numa frequência fixa de 1Hz e diferentes intervalos de temperatura (-130 °C a 20 °C para o silicone PDMS; -60 °C a 120 °C para o silicone CPE) foram realizados. Os módulos de perda de massa, módulo de armazenamento e o fator de perda de massa foram registrados em função da temperatura e os valores obtidos de temperatura de transição vítrea foram submetidos à análise estatística. A análise termo dinâmica revelou alterações nos valores de temperatura de transição vítrea para ambos os materiais, refletindo as possíveis mudanças na sua estrutura química e física, após diferentes procedimentos de desinfecção, talvez em virtude da reação de cisão da cadeia que provavelmente ocorreu durante os procedimentos de desinfecção. A exposição em energia de

micro-ondas e a imersão em solução de hipoclorito de sódio afetaram o silicone experimental CPE significativamente, enquanto que o PDMS apresentou alterações significativas após serem tratadas com a solução comercial de desinfecção. Para todos os protocolos de desinfecção, os valores de temperatura de transição vítrea diminuíram em comparação com o grupo controle, o qual apresentou uma dureza maior e valores mais elevados de temperatura de transição vítrea.

Pinheiro *et al.* (2014) investigaram as propriedades físicas, mecânicas e térmicas de um material experimental (Ortho Pauher) quando comparado a um silicone padrão ouro para a confecção de Próteses maxilofaciais (MDX4-4210), após envelhecimento e pigmentação. As variáveis de resposta foram dureza Shore A, alteração de cor e características micro-estruturais (Termogravimetria, Espectroscopia por Infravermelho e Calorimetria Exploratória Diferencial). Cento e sessenta espécimes circulares foram confeccionados e pigmentados intrínseca (PI) e extrinsecamente (PE) com pó de maquiagem. Após pigmentação foram divididos aleatoriamente nos grupos de envelhecimento (termociclagem, luz natural, luz ultravioleta e controle) simulando um (01) ano de uso clínico. Para o silicone MDX4-4210 com PI, houve diminuição da dureza nos grupos controle, termociclagem e luz natural, enquanto que no grupo com PE, um comportamento semelhante ocorreu nos grupos controle e termociclagem. Em relação a alteração de cor, no grupo PI não houve mudança de cor resultante de qualquer um dos processos de envelhecimento, enquanto que, no grupo PE, as principais alterações foram promovidas por termociclagem e luz UV ($p=0.004$). Para o silicone experimental, a dureza diminuiu apenas nas amostras com PI após a termociclagem. Para os outros métodos de envelhecimento, o material apresentou maior dureza. A alteração de cor do silicone experimental com PI foi maior no grupo envelhecido por luz ultravioleta, e com PE, a alteração foi maior após envelhecimento por termociclagem e luz ultravioleta. A termogravimetria demonstrou que os dois materiais avaliados apresentavam grande quantidade de compostos inorgânicos em sua composição e que ambos apresentaram estabilidade em altas temperaturas. A Espectroscopia indicou ausência de formação de subprodutos de polimerização e que, portanto, as diferentes pigmentações e envelhecimentos não promoveram a formação de novos produtos nas composições dos silicones. Por fim, a calorimetria exploratória diferencial demonstrou que as amostras pigmentadas extrinsecamente apresentaram maior entalpia de fusão (ΔH). Valores elevados de entalpia de fusão estão diretamente relacionados com a presença de ligações cruzadas em polímeros e são indicativas de estabilidade. Os autores concluíram que embora o silicone experimental tenha

apresentado maiores alterações de dureza e cor, a análise micro-estrutural indicou propriedades térmicas estáveis.

Com base na revisão de literatura, nota-se que ainda são necessárias mais pesquisas que consigam prevenir as alterações provocadas em consequência da pigmentação e condições de uso e manutenção das próteses, garantindo maior possibilidade de materiais aos profissionais reabilitadores da face e melhor qualidade de vida aos pacientes.

2. Soluções higienizadoras (*Ricinus communis* e gluconato de clorexidina)

Para a preservação da saúde geral dos pacientes e para a manutenção dos dispositivos protéticos, o contínuo aprimoramento dos métodos de higiene existentes é necessário e indispensável, além também da necessidade de análise e desenvolvimento de novas formulações que apresentem baixo custo, eficiente ação bactericida e fungicida e que não causem danos aos materiais constituintes das Próteses Maxilofaciais.

O *Ricinus communis* é uma planta de origem tropical, classificada como oleaginosa e de alto valor econômico em virtude das inúmeras possibilidades de uso comercial. Sua semente apresenta aproveitamento integral e através dela obtêm-se como produto principal o óleo de mamona que possui comprovada estabilidade em diferentes condições de temperatura, pressão e umidade (Costa *et al.*, 2004). O ácido ricinoleico é o principal componente do óleo de mamona e possui vasta utilização na indústria farmacêutica, produção de tintas, desinfetantes, biodiesel e matéria plástica (Costa *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005).

Especificadamente na área odontológica, o éster derivado do ácido ricinoleico tem sido estudado como soluções para irrigação de canais radiculares (Meneghin *et al.*, 2006; Camargo *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010) e bolsas periodontais (Ferreira *et al.*, 2002), bem como solução de higiene para próteses totais (Pisani *et al.*, 2010; Pisani *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2014; Segundo *et al.*, 2014) por apresentar comprovada ação antimicrobiana e poucos efeitos sobre os materiais constituintes das próteses.

A planta *Ricinus communis* é produzida em vários países, e em grande quantidade no Brasil, o que facilita o desenvolvimento de soluções higienizadoras específicas que possam ser comercializadas e disponibilizadas aos pacientes usuários de próteses maxilofaciais, uma vez que a manutenção da higiene dos aparelhos protéticos ainda é um desafio.

Um ponto importante a ser destacado é que a efetividade de um método de higienização deve ser avaliada por meio de testes clínicos e laboratoriais (Nikawa *et al.*, 1999) antes que possa ser instituído de forma segura aos pacientes. Sendo assim, a avaliação tanto

da solução experimental de mamona quanto da clorexidina que, por sua vez, já possui resultados bem estabelecidos e excelente aceitação odontológica, considerando parâmetros microbiológicos, faz-se necessária, sendo essencial a análise frente a micro-organismos patogênicos e considerados indicadores na avaliação da efetividade de um método de desinfecção ou esterilização (Cole *et al.*, 1996).

Da Silva *et al.* (2011) analisaram o efeito do hipoclorito de sódio e da clorexidina na viabilidade, remoção e morfologia do biofilme formado por *C. albicans* em resina acrílica, por meio de análise microscópica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Espécimes de resina acrílica foram confeccionados, imersos em meio de cultura inoculado com *C. albicans* e incubados por 90 minutos a 37°C. Após este período, os espécimes foram lavados para remoção das células não aderidas e novamente incubados. Após formação do biofilme, os espécimes foram divididos aleatoriamente nas soluções higienizadoras e imersos por 10 minutos (água destilada esterilizada – grupo controle, gluconato de clorexidina a 4%, hipoclorito de sódio a 1% e hipoclorito de sódio a 2%). Imediatamente após o período de imersão, cada espécime foi lavado para remoção dos micro-organismos fracamente aderidos e corados para análise em microscópio confocal. Além disso, três espécimes de cada grupo experimental foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, para análise morfológica das células fúngicas. As imagens da microscopia confocal das amostras tratadas com água destilada revelaram biofilme em estágio de proliferação das colônias e filamentação, enquanto as amostras tratadas com clorexidina apresentaram biofilme composto apenas por células mortas e o tratamento com o hipoclorito, nas duas concentrações, removeu a maioria das células do biofilme. O tratamento com clorexidina não promoveu alterações morfológicas das células de *C. albicans* enquanto que, para o hipoclorito, leveduras e hifas apresentaram alteração. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio é a solução de escolha para higienização de próteses confeccionadas em resina acrílica, uma vez que a solução de clorexidina a 4% não foi capaz de matar a *C. albicans*.

Pisani *et al.* (2012) avaliaram a dureza Knoop, rugosidade superficial e alteração de cor de dentes artificiais de diferentes marcas comerciais (Vipi, Biolux e Trilux), após imersão em água destilada, hipoclorito de sódio a 1% e solução experimental de *Ricinus communis* a 2%. As mensurações das propriedades foram realizadas imediatamente após a preparação das amostras (*baseline*) e após 15 e 183 dias de imersão. Os resultados mostraram aumento na dureza para as marcas comerciais Vipi e Biolux, sendo o Biolux responsável pelas maiores alterações. A solução experimental de *Ricinus communis* a 2% promoveu o maior aumento na dureza e o menor aumento na rugosidade. Não houve diferenças significativas na alteração de

cor entre as diferentes marcas comerciais e entre as soluções após 183 dias de imersão, embora todas tenham causado alterações nas propriedades analisadas.

Goiato *et al.* (2012) avaliaram a influência da desinfecção química e tempo de armazenamento na resistência a flexão de resinas acrílicas (resina N1 e resina incolor) comumente utilizadas na fabricação de próteses oculares, polimerizadas por micro-ondas. Duzentos e sessenta amostras foram confeccionadas, armazenadas e periodicamente desinfetadas com seis diferentes soluções (controle - sem desinfecção, sabão neutro, solução para lentes de contato Opti-free, Efferdent, hipoclorito de sódio a 1% e clorexidina a 4%). A resistência à flexão foi aferida antes e após 60 e 120 dias de armazenamento e desinfecção. A resistência à flexão da resina N1 foi maior do que para a resina incolor. Houve uma diferença significativa na resistência à flexão antes e após 60 e 120 dias de armazenamento e desinfecção, independentemente da resina e do agente desinfetante. Os autores concluíram que, para ambas as resinas, a resistência à flexão apresentou a maior alteração após 120 dias de armazenamento para as amostras desinfetadas com clorexidina, no entanto, os valores obtidos foram clinicamente aceitáveis e não contra indicam as resinas avaliadas.

Pisani *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade de cor, dureza e rugosidade de reembasadores macios (Elite e Mucopren) após de 7, 15 e 183 dias de imersão em diferentes soluções higienizadoras (água destilada, hipoclorito de sódio a 1% e solução experimental de *Ricinus communis* a 2%). Os resultados mostraram maior aumento na dureza e na rugosidade para o reembasador Mucopren soft, após sete dias de imersão. Após 15 dias de imersão, ambos os materiais apresentaram aumento na rugosidade. Ao final do período de imersão (183 dias), o reembasador Elite soft apresentou maior variação na rugosidade, sendo o hipoclorito de sódio a 1% responsável pelas maiores alterações. Os autores concluíram que, de maneira geral, considerando todos os períodos de imersão, o reembasador Elite soft apresentou a maior alteração de cor, sendo o hipoclorito de sódio responsável pelas maiores alterações.

Goiato *et al.* (2013) investigaram o efeito de ciclos térmicos e quatro métodos de desinfecção (energia de micro-ondas, Efferdent, Clorexidina a 4% e hipoclorito de sódio a 1%) na microdureza de quatro diferentes marcas comerciais de resinas acrílicas (Ondacryl, QC20, Clássico e Lucitone) para base de Prótese Total. As amostras foram desinfetadas por sessenta dias e submetidas a 1000 ciclos térmicos com variação de temperatura entre 5 e 55° C. A microdureza foi avaliada imediatamente após a confecção dos espécimes, após o primeiro ciclo térmico, após os regimes de desinfecção e, por fim, depois de finalizado os ciclos térmicos. Todos os grupos avaliados apresentaram redução dos valores de microdureza,

sendo a resina QC-20 responsável pelos menores valores da propriedade, independente do produto de desinfecção e dos ciclos térmicos. Os autores concluíram que os valores de microdureza das resinas acrílicas avaliadas sofreram influência dos ciclos térmicos e dos regimes de desinfecção, no entanto, todos os valores permaneceram dentro dos limites aceitáveis.

Segundo Moreno *et al.* (2013), materiais usados na confecção de próteses oculares devem apresentar durabilidade para indicação clínica segura. Portanto, faz-se necessário a investigação do comportamento físico dos materiais destinados a essa finalidade quando expostos à diferentes soluções desinfetantes. Assim, os autores avaliaram a influência de diferentes soluções desinfetantes (sabão neutro, Opti-free, Efferdent, hipoclorito de sódio a 1% e clorexidina a 4%) na microdureza e rugosidade superficial de resinas acrílicas para Próteses Oculares (resina N1 e resina incolor). As amostras foram armazenadas em solução salina a 37°C e desinfetadas durante 120 dias e a microdureza e rugosidade foram avaliadas antes, após 60 e 120 dias de desinfecção. A resina N1 mostrou menor microdureza quando comparado com a resina incolor e a clorexidina e o hipoclorito de sódio foram responsáveis pela maior alteração de microdureza e rugosidade. Observou-se um aumento da rugosidade e redução da microdureza de ambas as resinas acrílicas oculares após os dois períodos de desinfecção e armazenamento, independente da solução desinfetante. Os autores concluíram que ambos os períodos desinfecção afetaram a microdureza e rugosidade das amostras avaliadas.

Badaró *et al.* (2013) avaliaram uma solução de *Ricinus communis* para higiene de próteses totais, comparando-a ao hipoclorito de sódio, quanto à efetividade na remoção do biofilme, remissão de Candidíase Atrófica Crônica, grau de satisfação dos pacientes e rugosidade superficial da resina acrílica termopolimerizada. 64 usuários de próteses totais foram orientados a escovar suas próteses com escova específica e sabão neutro por 3 minutos, 3 vezes ao dia e imergi-las nas soluções de higiene (S1: Hipoclorito de sódio a 0,25%; S2: Hipoclorito de sódio a 0,5%; S3: *Ricinus communis* a 10%; S4: solução salina – controle) durante 20 minutos, por 7 dias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%. Não houve diferença na porcentagem de biofilme entre pacientes com e sem candidíase ($p=0,19$), bem como na interação entre os fatores ($p=0,85$). Houve diferença entre as soluções, sendo que o hipoclorito a 0,25 e 0,5% promoveu as menores médias de biofilme, seguido pela solução de *R. communis* a 10%. Para remissão da Candidíase, as soluções mais eficientes foram *R. communis* e Hipoclorito de Sódio a 0,25%. O questionário de satisfação não indicou diferença entre as soluções e a rugosidade da superfície polida não foi alterada

pelo período experimental. Os autores concluíram que há viabilidade do uso do hipoclorito de sódio em menores concentrações e da solução de *R. communis* para remoção de biofilme, remissão da Candidíase e controle da rugosidade superficial de próteses totais.

Pinelli *et al.* (2013) compararam a eficácia de uma solução de *Ricinus communis* com a Nistatina e o Miconazol no tratamento da estomatite protética de idosos institucionalizados. Trinta pacientes foram recrutados e divididos aleatoriamente nos grupos experimentais (n=10) e as avaliações clínicas e microbiológicas foram realizadas antes da utilização do antifúngico e após 15 e 30 dias de tratamento. Fotografias padronizadas foram obtidas da região do palato e a candidíase oral foi classificada segundo critérios de Newton. A avaliação microbiológica foi realizada no material coletado por raspagem da mucosa palatina e as espécies de *Candida* foram quantificadas por contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os autores observaram melhora significativa na aparência clínica nos grupos tratados com *Ricinus communis* e Miconazol, entretanto, nenhum grupo avaliado mostrou redução significativa das espécies de *Candida* ao longo do período experimental. Os autores concluíram que o *Ricinus communis* pode melhorar a condição clínica da estomatite protética em idosos institucionalizados e seus resultados são semelhantes aos do Miconazol.

Leite *et al.* (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de um dentifrício experimental à base de *Ricinus communis* para a higiene de Próteses Totais contra cepas padrão (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*). Foram utilizados dentifrícios nas concentrações de 1, 2, 5 e 10% e a ação antimicrobiana foi avaliada pelo teste de poço difusão em ágar e comparadas com os dentifrícios comerciais Colgate, Trihydral e Corega Brite. Os resultados mostraram que nenhum dos dentifrícios foi eficaz contra *E. coli*. O dentifrício experimental contendo *Ricinus communis* a 2, 5 e 10% mostrou-se efetivo contra *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis* e não mostrou atividade antimicrobiana contra *Candida spp.* em nenhuma das concentrações testadas. Trihydral foi o dentifrício mais eficaz. Comparando-se os dentifrícios experimentais entre si nas suas diferentes concentrações, o produto com 10% de *Ricinus communis* produziu as maiores zonas de inibição do crescimento bacteriano e teve atividade antimicrobiana semelhante aos dentifrícios comerciais, exceto contra *S. aureus*.

Segundo Andrade *et al.* (2014), a higienização de Próteses Totais é essencial, pois está intimamente relacionada com infecções orais e doenças sistêmicas. Apesar de existirem diversos agentes químicos no mercado, nenhum deles tem propriedades ideais. Os autores avaliaram a eficácia de uma solução experimental a base de *Ricinus communis*, em comparação a dois produtos tradicionais e bem reconhecidos em diversos trabalhos científicos

(hipoclorito de sódio e peróxidos alcalinos). Cinquenta voluntários usuários de Próteses Totais superiores foram orientados a escovar suas próteses após as refeições e mergulhar suas dentaduras uma vez por dia nas seguintes soluções: salina (20 min; controle), peróxido alcalino Polident (3 min), hipoclorito de sódio a 1% (20 min) e solução experimental de *Ricinus communis* a 2% (20 min). Os participantes da pesquisa utilizaram cada solução por sete dias consecutivos, de acordo com sequência aleatória. Após cada período, as superfícies internas das próteses totais superiores foram coradas com uma solução reveladora (1% de vermelho neutro), fotografadas e o biofilme quantificado com a ajuda de um software específico. As soluções testadas apresentaram diferença significativa, sendo a solução salina e o hipoclorito de sódio responsáveis pelas maiores alterações. Polident e a solução experimental de *Ricinus communis* a 2% apresentaram resultados intermediários. Os autores concluíram que a solução experimental de *Ricinus communis* a 2% foi comparável ao peróxido alcalino em termos de eficácia na remoção do biofilme.

Segundo *et al.* (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano de uma solução experimental de *Ricinus communis* a 2% sobre reembasadores de próteses totais à base de silicone, bem como sua integridade após higienização. 30 usuários de próteses totais tiveram suas próteses totais inferiores reajustadas com uso dos reembasadores e foram orientados a higienizar suas próteses por meio de: (A) escova de dente específica para prótese total e dentifrício; (B) imersão em solução *R. communis* experimental 2%; e (C) associação de A e B. Considerou-se a área de cobertura do biofilme (%), as contagens microbianas por meio da técnica de hidridação de DNA Checkerboard e a integridade física do reembasador macio, avaliados durante um intervalo de tempo de 60 dias. Empregou-se Análise de Variância e Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). O método mecânico (A) apresentou menor porcentagem de biofilme ($1,45 \pm 1,03$) em comparação com o método químico (B: $2,96 \pm 1,98$) e associado (C: $2,71 \pm 1,76$). Após 60 dias ($3,37 \pm 2,04$), o acúmulo de biofilme foi maior do que em 15 dias ($1,28 \pm 0,77$) e 30 dias ($2,46 \pm 1,54$). O reembasador foi menos deteriorado e manteve a sua integridade física quando o método mecânico foi aplicado e o método químico apresentou maior eficácia contra os micro-organismos avaliados, incluindo algumas espécies de *Cândida*. Os autores concluíram que a solução *R. communis* a 2% apresenta ação antimicrobiana superior à escovação.

3. Técnicas Moleculares de Diagnóstico Microbiológico

A colonização das diferentes cavidades que compõem o organismo humano inicia-se durante o nascimento e a presença de bactérias continua por toda a vida (Bowden *et al.*, 1995). São várias as espécies bacterianas responsáveis por esta colonização transitória, entretanto, se houver uma superfície favorável à sua aderência e permanência, essa colonização pode ser prolongada e prejudicial (Socransky *et al.*, 1971; do Nascimento, 2010). Este fato nos alerta para cuidados especiais em usuários de próteses maxilofaciais que podem apresentar a microbiota modificada em virtude da maior exposição ao meio ambiente pela localização das lesões (Morris-Jones *et al.*, 2002; Ariani *et al.*, 2012).

Técnicas moleculares de diagnóstico têm sido amplamente utilizadas em estudos clínicos para detectar e quantificar as espécies microbianas que podem colonizar diferentes regiões do corpo humano (Oakley *et al.*, 2008). São técnicas rápidas, sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas convencionais de cultura microbiana, as quais podem falhar ao detectar e identificar diferentes espécies que crescem somente em meios específicos ou em condições especiais de desenvolvimento. Ainda, os métodos moleculares de diagnóstico permitem uma precisa identificação das espécies bacterianas que apresentam um comportamento fenotipicamente divergente e são independentes da viabilidade celular, o que representa uma grande vantagem em relação às técnicas convencionais de cultura celular, onde a morte celular pode ocorrer ao longo do experimento (Pitt *et al.*, 2000; do Nascimento, 2010).

Dentre as técnicas de biologia molecular, a técnica de hibridação de DNA *Checkerboard* foi descrita pela primeira vez por Socransky *et al.* (1994) e consiste em detectar micro-organismos a partir de sondas de DNA genômicas que permite, simultaneamente, identificar e quantificar até 45 espécies bacterianas alvo em até 28 amostras clínicas, por membrana. Esta técnica tem sido amplamente usada em diferentes especialidades odontológicas para avaliar a composição microbiana do biofilme oral na saúde ou doença, além de possíveis variações em sua composição durante terapias medicamentosas ou periodontais, uma vez que permite a detecção direta de qualquer agente patogênico ou fúngico, cultivável ou não (do Nascimento *et al.*, 2012; do Nascimento *et al.*, 2014).

Socransky *et al.* (1998) avaliaram, por meio de diagnóstico molecular de DNA, a microbiota sub-gengival de 185 pacientes buscando observar possíveis interações microbianas a partir da divisão dos micro-organismos em cinco diferentes complexos, identificados por diferentes cores. Os resultados indicaram que a presença específica de uma bactéria é dependente da presença de pelo menos mais uma bactéria do mesmo complexo. Segundo os autores, os micro-organismos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forshytensis* e *T.*

denticola) estão associados às bolsas periodontais profundas e, ainda, relacionaram a presença destas bactérias com uma maior destruição dos tecidos periodontais. Concluíram também que estes micro-organismos estão fortemente relacionados aos do complexo laranja (*Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campylobacter*), sugerindo a existência de uma sucessão na colonização de acordo com os complexos. Os autores concluíram também que o complexo laranja é antecessor e menos agressivo que o vermelho.

Dahlen e Leonhardt (2006) avaliaram, em 50 indivíduos voluntários, a associação de treze novas bactérias periodontopatogênicas com doze patógenos periodontais consagrados, por meio da técnica do DNA *Checkerboard*. A partir dos resultados obtidos, os autores observaram que, das 25 amostras testadas, 24 foram detectadas mais frequentemente nos sítios com doença periodontal que em sítios saudáveis. Das novas espécies associadas com as doenças periodontais, apenas *Prevotella tanneriae*, *Filifactor alocis* e *Porphyromonas endodontalis* apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação aos sítios saudáveis e com doença periodontal. Os autores concluíram que estes micro-organismos devem ser considerados em conjunto com as 12 espécies já consagradas para o diagnóstico de periodontite associada à microbiota bacteriana.

Recentemente, a técnica de hibridação de DNA *Checkerboard* vem sendo utilizada em estudos clínicos e laboratoriais para a identificação e quantificação de espécies bacterianas em conexões protéticas de implantes osseointegráveis. Barbosa *et al.* (2009) compararam, *in vitro*, a infiltração bacteriana na interface implante-conector protético pelos métodos de cultura microbiana convencional e de diagnóstico molecular de DNA *Checkerboard*. Vinte implantes Branemark do tipo hexágono externo foram aleatoriamente divididos em dois grupos (n=10) e quantidades definidas de *Fusobacterium nucleatum* foram inoculadas no interior dos implantes e os componentes protéticos foram adaptados com um torque de 32 Ncm. Os conjuntos implante-conectores foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura esterilizado e incubados em condições de microaerofilia por 14 dias. Os tubos foram observados quanto à turvação do meio e, após sinais de contaminação, o conteúdo do interior dos implantes foi coletado e analisado pelos métodos propostos. Ambos os métodos mostraram contagens reduzidas de micro-organismos, no entanto, o número de contagens de *Fusobacterium nucleatum* foi maior pelo método de DNA *Checkerboard* quando comparado ao grupo analisado por cultura convencional. Os autores concluíram que o método de DNA *Checkerboard* mostrou-se mais sensível do que a cultura microbiana convencional na detecção dos micro-organismos.

Segundo Nascimento *et al.* (2013) diferentes espécies de *Candida* têm sido encontradas frequentemente em implantes de indivíduos saudáveis e doentes. Assim, os autores avaliaram a aderência de cinco diferentes espécies de *Candida*, por meio do método de DNA *Checkerboard* em diferentes substratos (titânio usinado, titânio fundido e zircônia). Dados de rugosidade superficial e área total abrangida pelos micro-organismos também foram fornecidos para correlação dos dados encontrados. Os participantes deste estudo *in situ* foram aconselhados a usar uma tala intra-oral contendo quatro discos do mesmo substrato, sendo dois localizados na região anterior e dois na região posterior. Os resultados mostraram valores maiores de rugosidade superficial para o substrato de zircônia e a área total da cobertura do biofilme não foi diferente nos três substratos testados. O substrato de zircônia apresentou os menores índices de aderência microbiana, seguido pelo titânio puro usinado e fundido. A região de colocação dos discos (anterior/posterior) não interferiu na adesão das diferentes espécies de *Candida*. Os autores concluíram que houve uma diferença significativa na contagem total de células entre os três diferentes grupos. Não houve correlação positiva entre a contagem celular, rugosidade superficial ou área total de biofilme formado.

Do Nascimento *et al.* (2014) avaliaram a eficácia de três diferentes soluções antimicrobianas na desinfecção de escovas de dente, após armazenamento em recipientes fechados. Foram utilizadas soluções de gluconato de clorexidina ou cetilpiridínio (grupos teste) e água de torneira esterilizada (grupo controle) para armazenamento das escovas por sete dias consecutivos. Cultura celular convencional e DNA *Checkerboard* foram usados para detectar a contaminação bacteriana sobre as escovas de dente. Tanto o teste de cultura celular convencional quanto o de DNA *Checkerboard* mostraram sinais positivos de contaminação bacteriana nas escovas de dente, sem diferença na frequência de detecção. O grupo controle apresentou contagens de bactérias totais mais elevadas quando comparados com os grupos teste. *Porphyromonas gingivalis* teve a contagem de UFC mais elevada, seguido por *Parviromonas*. Os autores concluíram que tanto o teste de cultura celular convencional quanto o de DNA *Checkerboard* mostraram sinais positivos de contaminação bacteriana. Concluíram também que enxaguatórios que contêm 0,12% de gluconato de clorexidina foram mais eficazes na redução da colonização bacteriana sobre as escovas de dente.

Murad *et al.* (2014) investigaram a composição da microbiota de canais radiculares em fracassos endodônticos, buscando identificar e quantificar os micro-organismos responsáveis. Amostras microbiológicas foram retiradas de 36 canais radiculares com infecção endodôntica persistente e a presença, níveis e proporções de 79 espécies bacterianas foram determinadas pelo método de DNA *Checkerboard*. *Enterococcus faecium* (36%), *Streptococcus epidermidis*

(36%), *Eubacterium saburreum* (28%), *Parvimonas micra* (28%), *Streptococcus sanguis* (28%), *Capnocytophaga sputigena* (28%), *Leptotrichia buccalis* (28%), *Enterococcus faecalis* (28%) e *Staphylococcus warneri* (28%) foram as espécies mais predominantes. Houve uma baixa prevalência de *Treponema socranskii* (3%), *Fusobacterium periodonticum* (3%), *Capnocytophaga gingivalis* (3%) e *Spiroplasma ixodetis* (3%) e os mais altos níveis médios foram encontrados para as seguintes espécies: *E. faecium*, *Dialister pneumosintes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Helicobacter pylori*. Houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de espécies Gram-negativas e Gram-positivas e foi encontrada uma correlação positiva entre a área da lesão periapical e os níveis de espécies Gram-negativas. Os autores concluíram que a microbiota de dentes com periodontite apical persistente apresenta um perfil diverso e complexo, sendo *E. faecium* e *S. epidermidis* as espécies mais altamente prevalentes.

Ainda, a partir da Revisão de Literatura acerca das técnicas moleculares de diagnóstico e sua relação com inúmeras espécies microbianas nota-se a ausência de estudos científicos que demonstrem tal relação e Próteses Maxilofaciais e tecidos adjacentes. Assim, são necessárias mais pesquisas que consigam identificar a microbiota predominante em usuários deste tipo de prótese, possibilitando o desenvolvimento de soluções higienizadoras específicas que garantam maiores possibilidades aos profissionais reabilitadores da face e melhor qualidade de vida aos pacientes.

Proposição

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Identificar e comparar a contagem de micro-organismos presentes em próteses maxilofaciais e tecidos adjacentes, pelo Método de hibridação de *DNA Checkerboard*.
2. Avaliar o efeito de diferentes protocolos de higienização sobre a alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de água de espécimes pigmentados, confeccionados com um silicone experimental para Prótese Maxilofacial, quando comparado a um comumente utilizado na especialidade;
3. Avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), a superfície dos espécimes após a utilização dos diferentes protocolos de higienização.
4. Avaliar, laboratorialmente, a ação antimicrobiana dos diferentes protocolos de higiene, sobre os principais micro-organismos identificados pelo método de *DNA Checkerboard*, em espécimes confeccionados com os silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin, pigmentados por meio da adição de pó de maquiagem.

Material e Métodos

1. Identificação (*in vivo*) de micro-organismos presentes em biofilme de próteses maxilofaciais e tecidos adjacentes, pelo método de hibridação de *DNA Checkerboard*

1.1 Seleção dos participantes

Para obtenção das amostras de biofilme, 43 usuários de próteses maxilofaciais foram convidados a participar do estudo, após comprovados os critérios de inclusão. O tamanho da amostra foi calculado para um poder de teste de 80%. Aos voluntários foi facultado o direito de decidir sobre sua participação neste estudo e orientações foram fornecidas quanto aos procedimentos que seriam realizados.

Uma vez verificada a possibilidade de recrutamento do participante, a ele foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) bem como um questionário para coleta de dados sócio-demográficos e descrição das características da lesão e da prótese em uso (Apêndice B). O presente estudo foi realizado com a devida apreciação e aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP-USP (CAAE: 12956313.2.0000.5419; Anexo 1).

Como critérios de inclusão, foram considerados:

- ✓ Usuários de próteses maxilofaciais, podendo ser obturadoras palatinas, obturadoras faringeanas, nasais, auriculares, oculares ou óculo-palpebrais, há pelo menos seis meses;
- ✓ Próteses em contato direto com lesões que não foram recobertas por enxerto e nem reconstruídas por meio de cirurgia plástica;
- ✓ Usuários de próteses confeccionadas em resina acrílica ou silicone;
- ✓ Boa saúde geral e capacidade de comunicação com o pesquisador;
- ✓ Aceite do protocolo de coleta do biofilme instituído pelo pesquisador;
- ✓ Superfície de assentamento da prótese sadia, sem sinais de inflamação ou infecção;
- ✓ Prótese com retenção e estabilidade consideradas satisfatórias;
- ✓ Participantes de ambos os sexos, independente da faixa etária.

Como critérios de exclusão, foram considerados:

- ✓ Próteses com a superfície interna deteriorada ou com áreas extensas de fratura e/ou emendas;
- ✓ Possuir o hábito de fumar;

- ✓ Uso de antibióticos e/ou antifúngicos nos últimos 3 meses.

1.2 Coleta do biofilme Maxilofacial

Escovas do tipo *microbrush* esterilizadas (microaplicadores odontológicos, tamanho regular, Vigodente Coltene SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram friccionadas sobre a superfície interna da prótese e dos tecidos adjacentes de cada paciente (Figura 1). Para viabilizar a coleta da maior quantidade de micro-organismos possível, foram usadas quatro escovas para cada sítio.

Figura 1 - A: Paciente usuário de prótese Maxilofacial e voluntário da pesquisa; B: Tecidos adjacentes à lesão Maxilofacial – sítio de coleta; C: Prótese Maxilofacial – sítio de coleta.

Posteriormente, as pontas ativas das escovas foram depositadas em um microtubo individual (Microtubes MCT 150C, 1,5mL, Axigen Inc. Union City, CA, USA) contendo 150 μ L de solução TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6), aos quais, foram adicionados 150 μ L de NaOH 0,5M. O tubo foi armazenado a 4°C, até o processamento laboratorial (HAFFAJEE *et al.*, 1998).

As etapas envolvidas na identificação dos micro-organismos pelo método de hibridação de DNA *Checkerboard* foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP de acordo com a técnica proposta por Socranski *et al.*, 1994 e modificada por Nascimento *et al.*, 2010.

1.3 Seleção dos micro-organismos alvos de detecção

Para a identificação microbiana pela técnica de DNA *Checkerboard*, micro-organismos previamente selecionados devem ser empregados. Sendo assim, foram utilizados DNA de 38 espécies padrão que compõem o acervo de micro-organismos do laboratório, para

serem alvos de detecção. Tais micro-organismos desempenham papel importante no desenvolvimento de diversas doenças decorrentes da colonização de sítios dentários, bem como de sítios da região maxilofacial. Os micro-organismos selecionados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Espécies de micro-organismos alvos de detecção utilizadas no presente estudo.

Espécies microbianas	Espécies microbianas
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans a</i>	<i>Solobacterium moorei</i>
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans b</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Mycoplasma salivarium</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Porphyromonas anaeróbicus</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida kruzei</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Candida tropicalis</i>

1.4 Processamento das amostras pela técnica de hibridação de DNA Checkerboard

1.4.1 Confecção das sondas genômicas de DNA

Para a marcação das sondas genômicas dos micro-organismos alvos de detecção utilizou-se a técnica estabelecida pela empresa fabricante do marcador genômico (Amersham Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico do micro-organismo a ser estudado, atingindo uma concentração final de 3 ng/μL em solução de hibridação.

Os DNAs dos micro-organismos padrão foram diluídos dentro de microtubos a uma concentração de 10 ng/μL, em um volume final de 10 μL. Os DNAs foram então

desnaturados em água fervente por 5 minutos e imediatamente resfriados em gelo durante 5 minutos, para manter as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os tubos mantidos no gelo, foram adicionados os reagentes do kit de marcação (Figura 2), sendo 10 µL de Reagente buffer, 2 µL de Labelling reagent e 10 µL de *cross-link* solution (Amersham Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Os tubos foram levemente agitados e incubados a 37°C, por 30 minutos.

Figura 2 – A: Kit de marcação das sondas genômicas dos micro-organismos alvos de detecção; B: reagentes do kit de marcação; C: Tubos com sondas genômicas dos micro-organismos alvos de detecção marcadas.

1.4.2 Sensibilidade e especificidade das sondas marcadas

A sensibilidade do ensaio foi otimizada para permitir a observação de reações de hibridação positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células de cada espécie microbiana, de acordo com o proposto por Socransky *et al.* (1994). Os sinais foram avaliados com o auxílio do software *Image Quant TL* (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), comparando-se os sinais das reações de hibridação dos DNAs dos micro-organismos coletados nos pacientes com as sondas genômicas dos micro-organismos alvos de detecção.

1.4.3 Processamento das amostras de biofilme coletadas dos participantes

Os microtubos armazenados a 4°C contendo as amostras de biofilme coletadas dos participantes foram descongelados à temperatura ambiente e agitados por 4 minutos em um agitador de tubos (AP 56, Phoenix, São Paulo, São Paulo, Brasil), visando a total desagregação do material coletado pelas escovas *microbrush*. Posteriormente, foram fervidos por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA e resfriados em gelo por 5 minutos (Figura 3), para manutenção das cadeias de nucleotídeos abertas. Após completa desnaturação, as amostras foram neutralizadas com uma alíquota de 800 µL de acetato de amônio a 5M.

Figura 3 – A: Amostras em fervura para desnaturação das fitas de DNA; B: Amostras mantidas em gelo para manutenção das cadeias de nucleotídeos abertas.

Uma membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), carregada positivamente e medindo 15x15 cm foi adaptada ao aparelho Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, Massachusetts, EUA) (Figura 4A), utilizado para aplicação das amostras de DNA. Este aparelho possui 30 canaletas dispostas paralelamente, nas quais podem ser depositadas, consecutivamente, até 28 amostras com diferentes DNAs, e duas amostras controle. O DNA dos micro-organismos coletados no biofilme dos participantes, juntamente com as alíquotas de DNA genômico extraído das cepas padrão, correspondentes à concentração de 10^5 e 10^6 células de cada espécie, foram depositados individualmente no aparelho Minislot 30 com auxílio de uma pipeta automática de precisão (Figura 4B).

Figura 4 – A: Adaptação da membrana de nylon (15 x 15 cm) no aparelho Minislot 30. B: Deposição das amostras nas canaletas do aparelho Minislot 30 com o auxílio de uma pipeta automática de precisão.

Cada amostra de DNA e os respectivos padrões foram concentrados a vácuo com o auxílio de uma bomba a vácuo conectada diretamente ao aparelho Minislot 30 (Figura 5), para que os DNAs pudessem ser depositados sobre a membrana. Em seguida, a membrana foi removida do aparelho, envolta em papel seco (Figura 6) e levada em um forno de hibridação (Hybridization Oven Shaker, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

(Figura 7) em temperatura monitorada de 80°C, por duas horas, para fixação dos DNAs na membrana por exposição ao calor.

Figura 5 – Aparelho Minislot 30 conectado à bomba a vácuo, para concentração das amostras.

Figura 6 – A: Membrana de nylon preparada para exposição em forno de hibridação em temperatura monitorada de 80°C, por duas horas; B: Membrana envolta em papel seco.

Figura 7 – Forno de hibridação para fixação dos DNAs na membrana.

1.4.4 Pré-hibridação das amostras

Após fixação dos DNAs das amostras e controles na membrana, a mesma foi pré-hibridada em forno (Hybridization Oven Shaker, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a 60°C, por 2 horas sob agitação suave, em uma solução contendo NaCl 1M (Merck, São Paulo, São Paulo, Brasil) e Blocking reagente 4% (GE Healthcare,

Buckinghamshire, UK), diluídos em 30 mL de solução de hibridação (Hybridization Buffer, GE, Healthcare, Buckinghamshire, UK) (Figura 8).

Figura 8 – Adição da solução na membrana para pré-hibridação em forno, sob agitação.

1.4.5 Aplicação das sondas de DNA e reações de hibridação

Após as duas horas de pré-hibridação, a membrana foi removida do forno e posicionada em um aparelho acrílico denominado Miniblotter 45 (Immunetics, Boston, Massachusetts, Estados Unidos) para aplicação individual das sondas marcadas (Figura 9A). Este aparelho permite a aplicação simultânea de até 45 amostras distintas. A membrana foi posicionada de forma que as amostras de DNA previamente aplicadas ficassem posicionadas perpendicularmente em relação às canaletas do aparelho Miniblotter 45, formando um padrão de 30 amostras x 45 sondas genômicas.

Cada canaleta foi utilizada para reações de hibridação independentes. Quantidades de sondas genômicas pré-estabelecidas foram aplicadas individualmente no interior de cada canaleta (Figura 9B). Posteriormente à aplicação das sondas, o aparelho Miniblotter foi embrulhado várias vezes em filme de PVC (Figura 10), para prevenir a desidratação da membrana. A hibridação da membrana deu-se em forno de hibridação (Hybridization Oven Shaker, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a 60°C, sob agitação suave, por 16 horas.

Figura 9 – A: Aparelho acrílico Miniblotter 45. B: Aplicação individual das sondas marcadas.

Figura 10 –Miniblotter 45 selado em filme de PVC para evitar a desidratação da membrana.

1.4.6 Lavagem da membrana

Após a reação de hibridação, a membrana foi lavada (Figura 11), a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Inicialmente, foram realizadas duas lavagens de 35 minutos cada, a 60°C em forno sob vigorosa agitação (Hybridization Oven Shaker, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), com 500 mL de uma solução contendo Urea 2M (Sigma), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 0,1M (Sigma, São Paulo, São Paulo, Brasil), NaH_2SO_4 50 mM (Merck, São Paulo, São Paulo, Brasil), NaCl 150 mM (Merck), MgCl_2 1mM e *Blocking* Reagente (GE Healthcare). Duas outras lavagens posteriores a essas foram realizadas em temperatura ambiente, durante 15 minutos cada, com 500 mL de uma solução contendo Tris 1M (Sigma), NaCl (Merck) e MgCl_2 (Merck).

Figura 11 – Lavagem da membrana para remoção de sondas não hibridizadas.

1.4.7 Deteccção dos sinais de hibridação

A detecção dos sinais de hibridação foi realizada através de uma reação de quimioluminescência. 6,7 mL de um reagente de detecção CDP-Star® (Amersham Biosciences) foi aplicado sobre a membrana, que agiu por toda a sua superfície por cinco minutos. Após este período, o excesso de reagente foi removido e a membrana foi selada em filme de PVC (Figura 12) para o procedimento de exposição (auto-radiografia).

1.4.8 Exposição da membrana e revelação

As membranas seladas foram posicionadas dentro de um cassete apropriado (Hypercassette, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) (Figura 13) para exposição em filme de auto-radiografia (HyperFilm, GE Healthcare). As membranas foram expostas por 30 minutos e, posteriormente, os filmes foram revelados e fixados em solução para processamento radiográfico convencional (Kodak, Manaus, Amazonas, Brasil). Ao final deste processo, foi obtido um filme radiográfico com os sinais de hibridação detectados pelas intersecções entre as amostras de biofilme coletado e sondas genômicas das espécies padrão, onde as linhas horizontais representam as sondas marcadas das espécies padrão e as linhas verticais representam as amostras do biofilme, configurando um tabuleiro de xadrez (Figura 13). Os sinais no cruzamento das linhas representam os híbridos obtidos.

Figura 12 – A/B: Colocação da membrana em cassete apropriado para auto-radiografia.

Figura 13 – Esquema adaptado de [Do Nascimento, Cássio. Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante – conector protético sob aplicação de carga – avaliação in vitro pelo método de DNA Checkerboard. 2010. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010] exemplificando a reação de hibridação pelo método de DNA-Checkerboard, onde as linhas horizontais representam as sondas das espécies padrão e, as linhas verticais as amostras de biofilme coletado dos participantes.

1.4.9 Interpretação dos sinais de hibridação

Para a obtenção dos resultados, os filmes radiográficos foram digitalizados e as imagens inseridas no software *Image Quant TL* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). O software permite a obtenção do número aproximado de células microbianas presente em cada amostra avaliada, através da comparação da intensidade dos sinais de hibridação. A leitura dos resultados obtidos é semi-quantitativa, feita por meio da comparação da intensidade dos sinais de hibridação obtidos pela intersecção das amostras testadas contra as sondas marcadas em relação às amostras controle colocadas nas duas últimas canaletas do aparelho Minislot 30.

2. Avaliação do efeito de protocolos de higiene sobre a alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos de espécimes pigmentados, confeccionados com um silicone experimental e um silicone padrão para Prótese Facial

2.1 Delineamento experimental

As variáveis de resposta quantitativa foram obtidas em espécimes confeccionados com os materiais MDX 4-4210 e Bio-Skin (experimental) (Figura 14), com e sem adição de pigmento de pó de maquiagem (Goiato *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2014), opacificador (Kiat-Amnuay *et al.*, 2010) e associação de ambos (Figura 15), antes e após a exposição a três protocolos de higiene associando escovação com imersão em água destilada, gluconato de clorexidina a 0,12% ou solução de *Ricinus communis* a 10%. Os materiais citados acima e utilizados no presente estudo, bem como suas respectivas procedências estão listados na tabela 2.

Figura 14 – A: Silicone MDX 4-4210; B: Silicone Bio-Skin (experimental).

Figura 15 – A: Pó de maquiagem; B: Opacificador.

Tabela 2 – Materiais utilizados nesta etapa do estudo e respectivas procedências.

Material	Fabricante / Cidade / Estado / País
Silicone MDX 4-4210	Dow-Corning Corporation, Midland, EUA.
Silicone Bio-Skin	Ortho Pauher Indústria e Comércio Ltda., Recife, Pernambuco, Brasil.
Pó compacto para maquiagem cor 01	Riscoti Cosméticos Ltda., Cajuru, São Paulo, Brasil.
Opacificador Sulfato de Bário (BaSO_4)	Panreac Química, Barcelona, Espanha.
Gluconato de Clorexidina a 0,12%	Colgate Company, São Paulo, São Paulo, Brasil.
<i>Ricinus communis</i> a 10%	Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.
Sabão líquido neutro	Pleasant, Perol Comercial e Industrial Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil.
Escova dental TEK macia	Johnson & Johnson Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

No total, foram confeccionados 240 espécimes em função dos fatores de variação, sendo 2 materiais (MDX 4-4210 e Bio-Skin) x 4 pigmentações (incolor – controle; pó de maquiagem; opacificador; opacificador + pó de maquiagem) x 3 protocolos de higiene (imersão em gluconato de clorexidina 0,12% + escovação com sabão neutro; imersão em solução de *Ricinus communis* 10% + escovação com sabão neutro; imersão em água destilada + escovação com sabão neutro – controle) x 10 repetições. As variáveis de resposta quantitativas foram alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos.

2.2 Obtenção dos corpos de prova

Foram obtidos 240 corpos de prova circulares (15 mm de diâmetro x 3 mm de espessura), sendo 120 com cada material. A escolha do formato dos espécimes para realização dos ensaios físico-mecânicos foi determinada para que os resultados pudessem ser confrontados com a literatura existente (Han *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013).

Os materiais foram manipulados em temperatura ambiente monitorada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) respeitando as orientações dos respectivos fabricantes, sendo utilizada a proporção de 10:1 para o silicone MDX 4-4210 e 1:1 para o Bio-Skin. As proporções foram obtidas por meio da pesagem dos materiais em balança analítica de precisão (Metler Toledo GmbH Laboratório e Tecnologias de Pesagem, Greifensee, Suíça).

Para o silicone MDX 4-4210, as pastas base e catalisadora foram levadas em um espatulador a vácuo (Turbomix, EDG, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) (Figura 16A) por 120 segundos para prevenir a incorporação de bolhas. Para o silicone Bio-Skin, as massas base e catalisadora foram inicialmente aglutinadas pelas mãos e em seguida levadas a um cilindro laminador (CL 300 SL, G Paniz, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) (Figura 16B) por 20 ciclos para homogeneização das massas bem como para incorporação dos pigmentos, quando estes foram acrescentados para formação dos grupos de pigmentação.

Figura 16 – A: Espatulador a vácuo usado para homogeneização do silicone MDX 4-4210. B: Cilindro laminador usado para homogeneização do silicone Bio-Skin.

Para obtenção dos espécimes, moldes retangulares em teflon medindo 12 mm comprimento x 4 mm largura x 3 mm profundidade, foram preenchidos com cada um dos silicones de forma a obter um lençol de silicone padronizado (Figura 17), a partir do qual foram obtidos os corpos de prova circulares.

Figura 17 – A: Moldes retangulares em teflon (12 mm comprimento x 4 mm largura x 3 mm profundidade); B: Moldes preenchidos com o silicone para obtenção dos lençóis.

Os moldes preenchidos com os silicones foram levados para o interior de uma panela pneumática (VH Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) (Figura 18A) por 30 minutos para eliminação de possíveis bolhas, em pressão de 20 libras e, posteriormente, em estufa odontológica (Odontobrás Ind. e Comércio Equip. Med. Odont. Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 18B) para polimerização. Para o silicone experimental Bio-Skin a polimerização deu-se a uma temperatura de 120°C, por 30 minutos e para o para o MDX 4-4210, a temperatura empregada foi de 100°C, pelo mesmo período. Uma vez polimerizados, o lençóis de silicone foram cortados com um vazador afiado com 15 mm de diâmetro (Figura 19). Esta metodologia teve como objetivo obter corpos de prova padronizados, sem variação nas proporções de pasta base/catalisadora, bem como dos agentes pigmentadores.

Figura 18 – A: Panela pneumática. B: Estufa odontológica utilizada na polimerização dos silicones.

Figura 19 – Vazador afiado usado para obtenção dos corpos de prova circulares.

2.3 Obtenção dos grupos com diferentes pigmentações

Durante a manipulação dos materiais, foram acrescentados ou não os pigmentos de pó de maquiagem e/ou opacificador, resultando na formação dos seguintes grupos:

- ✓ GC: grupo controle - silicone puro, sem adição de pigmento ou opacificador;
- ✓ GP: grupo pigmentado com pó de maquiagem;
- ✓ GO: grupo pigmentado com opacificador;
- ✓ GPO: grupo pigmentado com pó de maquiagem + opacificador.

2.3.1 Obtenção do grupo controle (GC)

Para o grupo GC, os corpos de prova foram obtidos em silicone puro, sem adição de pigmento ou opacificador. Os silicones foram manipulados em ambiente com temperatura monitorada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e foi utilizada a proporção indicada pelos fabricantes. Após manipulação e homogeneização, os silicones foram inseridos nos moldes retangulares e então levados para polimerização em estufa conforme exemplificado anteriormente. A figura 20 exemplifica a inserção do silicone Bio-Skin nos moldes, com o auxílio de um cilindro. Como o silicone MDX4-4210 apresenta uma consistência fluida, este foi despejado no interior do molde (Figura 21).

Figura 20 – A: Acomodação do silicone Bio-Skin, grupo controle nos moldes; B: Regularização do silicone Bio-Skin nos moldes retangulares com o auxílio de um cilindro manual.

Figura 21 – Inserção do silicone MDX 4-4210 no interior dos moldes.

2.3.2 Obtenção do grupo pigmentado com pó de maquiagem (GP)

Para o grupo GP, foi utilizada uma proporção de 100g de silicone para 2 g de pigmento (Yu; Koran; Craig, 1980). O pó de maquiagem foi pesado em balança analítica de precisão (Figura 22) e incorporado à pasta base dos silicones. Posteriormente, as pastas catalisadoras foram adicionadas e a mistura foi homogeneizada no espátulador a vácuo por 120 segundos para o MDX 4-4210 e no cilindro laminador por 20 ciclos para o Bio-Skin

(Figura 23), conforme instruções dos fabricantes. Os silicones pigmentados foram inseridos nos moldes e levados em estufa para polimerização.

Figura 22 – Pesagem do pó de maquiagem em balança analítica de precisão.

Figura 23 – A/B: Homogeneização do silicone Bio-Skin em cilindro laminador por 20 ciclos.

2.3.3 Obtenção do grupo pigmentado com opacificador (GO)

Para o grupo GO, adicionou-se o opacificador BaSO_4 equivalendo a 2% do peso do silicone (2g de BaSO_4 /100g de silicone) (Haddad *et al.*, 2011). O opacificador foi pesado em balança analítica de precisão e incorporado à pasta base e em seguida acrescentou-se a pasta catalisadora para término da manipulação, em espatulador a vácuo para o silicone MDX 4-4210, e no cilindro laminador para o silicone Bio-Skin.

2.3.4 Obtenção do grupo pigmentado com pó de maquiagem associado ao opacificador (GPO)

Para o grupo GPO, foi utilizada a seguinte proporção: 100g de silicone (pasta base + catalisadora) / 1g de pó de maquiagem e 1g de opacificador, sendo os pigmentos equivalentes a 2% do peso da massa final (Haddad *et al.*, 2011; Figura 24).

Figura 24 – Dosagem do opacificador e pó de maquiagem para pigmentação do grupo pigmentado pela associação de ambos os pigmentos. A: Opacificador. B: Pó de maquiagem.

Finalizada a polimerização, os lençóis de silicone foram cortados (Figura 25) e as dimensões de cada corpo de prova foram verificadas com o auxílio de um paquímetro digital (CD-6 CSX-B, Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, SP, Brasil).

Figura 25 – Aspecto final dos corpos de prova obtidos a partir do lençol de silicone. A: GC (grupo controle); B: GP (grupo pigmentado com pó de maquiagem); C: GO (grupo pigmentado com opacificador); D: GPO (grupo pigmentado com pó de maquiagem associado ao opacificador).

2.4 Protocolos de higienização

Após obtenção dos corpos de prova, os mesmos foram distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos de higienização:

- ✓ EA: Imersão em água destilada esterilizada + escovação com sabão neutro (grupo controle);
- ✓ ECl 0,12%: Imersão em gluconato de clorexidina a 0,12% + escovação com sabão neutro (de Andrade et al., 2012);
- ✓ ERc 10%: Imersão em solução de *Ricinus communis* a 10% + escovação com sabão neutro (Badaró et al., 2013).

Os protocolos de higienização simularam um período de 12 meses para todos os grupos. Primeiramente, os espécimes foram imersos nas soluções higienizadoras por cinco dias, simulando assim imersões diárias de 20 minutos feitas diariamente ao longo de um ano (Quadro 1). Durante o período de imersão, as soluções foram trocadas diariamente e os espécimes mantidos em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker modelo CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil), em temperatura controlada de $\pm 37^{\circ}\text{C}$.

Quadro 1 – Cálculo do período para simulação de um ano de imersões diárias de 20 minutos.

1 dia	20 minutos
365 dias	7300 minutos
1 dia	1440 minutos
5 dias	7300 minutos

Finalizado o período de imersão, os corpos de prova de cada grupo foram lavados em água corrente por 5 minutos, para eliminação de qualquer resíduo das soluções e iniciou-se a escovação mecânica com o auxílio de uma máquina do tipo Pepsodent (MAVTEC – Com. Peças, Acess. e Serv. Ltda. ME, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (Figura 26). Como os corpos de prova confeccionados são circulares, eles foram posicionados em suportes acrílicos (Plex-glass, resina acrílica pré-fabricada) de forma que permitisse sua adaptação na máquina.

Figura 26 – Máquina de escovação mecânica do tipo Pepsodent.

Uma vez que a máquina de escovação utilizada possui 6 cubas para escovação, doze amostras foram escovadas simultaneamente (Figura 27), com velocidade de 356 rotações/minuto e curso percorrido pela escova correspondente a 3,8 centímetros. As escovas (TEK, macia) tiveram seus cabos cortados (Figura 28) para serem encaixadas e fixadas por meio de parafusos colocados nas laterais e na parte superior do suporte da máquina. O ajuste correto desses parafusos permitiu o nivelamento adequado da escova.

Figura 27 – A: Adaptação dos corpos de prova aos pares nos suportes acrílicos. B: Corpos de prova posicionados aos pares na cuba da máquina de escovação.

Figura 28 – Escovas com os cabos cortados para adaptação na máquina de escovação.

Para a escovação, uma suspensão com 10 mL de sabão neutro e 10 mL de água destilada (proporção 1:1) foi vertida nas cubas da máquina, sobre os corpos de prova. O tempo de escovação foi de 50 minutos (17800 ciclos), uma vez que corresponde a um ano de escovação por um indivíduo saudável (Takeuchi *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2014). Terminado o ensaio de escovação, os corpos de prova foram removidos da máquina, lavados com água corrente e secos em papel absorvente.

1.5 Realização dos ensaios para mensuração das variáveis de resposta

2.5.1 Alteração de cor

A análise da alteração de cor (ΔE) foi realizada com o auxílio de um espectrocolorímetro portátil (Color Guide 45/0, BYK-Gardner GmbH, Geretsried, Alemanha) (Figura 29), que utiliza o sistema de cores Standart Commission Internationale de L'Eclairage (CIE LAB), recomendado pela American Dental Association (Councils on Dental Materials and Devices, 1983). Esse sistema representa as cores em coordenadas tridimensionais ao longo de três eixos: eixo L^* , eixo a^* e eixo b^* . O eixo L^* representa a luminosidade da cor; o eixo a^* representa a posição da cor entre vermelho e verde, com valores positivos indicando vermelho e, por fim, o eixo b^* representa a posição da cor entre amarelo e azul, com valores positivos indicando amarelo. Um aspecto importante do sistema CIE-LAB é que a diferença de cor entre os tempos pode ser dada usando um parâmetro, ΔE_{ab} . A alteração de cor entre cada corpo de prova, cada uma dada em termos de L^* , a^* e b^* , foi realizada após a obtenção

dos espécimes e após o término dos protocolos de higiene. A variação de cor ocorrida neste período foi calculada pela seguinte fórmula: $\Delta E_{ab} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{\frac{1}{2}}$.

Figura 29 - Espectrocolorímetro portátil modelo Color Guide 45/0.

2.5.2 Dureza Shore A

O ensaio de dureza permite verificar o grau de maciez dos silicones e foi realizado com o auxílio de um durômetro Shore A (Instrument and Manufacturing Co Inc, Frieport, Nova York, Estados Unidos) (Figura 30), que consiste em um penetrador com ponta sem corte acionada por uma alavanca e ligado a uma escala de gravação que varia de 0-100 unidades Shore A. Quanto mais o penetrador penetra o espécime, menor é o valor de dureza. Silicones com valores de dureza até 40 unidades Shore A são considerados muito macios; valores entre 40 e 60 unidades Shore A o classificam em macios e, por fim, valores acima de 60 unidades Shore A como pouco macios (www.ufpr.edu.br). Para a realização do ensaio, os corpos de prova foram posicionados sob a haste vertical do durômetro a uma distância de aproximadamente 2 mm da ponta de penetração e submetidos à força constante de 1 kg por 5 segundos e o valor da dureza foi registrado no marcador analógico (ASTM 2240-64). Um operador previamente calibrado realizou cinco mensurações de dureza em cada espécime para obtenção de um valor médio e os resultados foram fornecidos em unidades Shore A (ASTMD2240-81, 1983). A dureza foi mensurada imediatamente após a obtenção dos espécimes (Di) e após os protocolos de higiene (Df) e o módulo da variação obtida no período ($\Delta D_f - D_i$) foi utilizado na análise estatística dos dados.

Figura 30 – Durômetro Shore A.

2.5.3 Rugosidade superficial

O ensaio de rugosidade superficial foi realizado com o auxílio de rugosímetro digital (Surfest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japan) (Figura 31) calibrado em uma velocidade de 0,5 mm/s, distância de 4,8 mm, comprimento de leitura de 4,0 mm e “cut-off” de 0,8 mm e um operador previamente calibrado realizou três mensurações em cada espécime para obtenção de um valor médio. As leituras foram realizadas no centro do corpo de prova e a 1,0 mm deste, movimentando a base do rugosímetro para a direita e para a esquerda (Figura 32) de cada corpo de prova, para obtenção dos três valores de leitura. Foi adotado o grau de precisão de 0,01 μm e os resultados obtidos fornecidos em Ra, que é a média aritmética entre picos e vales. As mensurações foram realizadas imediatamente após a obtenção dos espécimes (R_i) e após os protocolos de higienização (R_f), e a variação obtida no período ($R_f - R_i$) foi utilizada na análise estatística.

Figura 31 – Rugosímetro (Surfest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japan) utilizado no presente estudo.

Figura 32 – Representação esquemática dos locais de referência para a leitura de rugosidade superficial.

2.5.4 Absorção de líquidos

Imediatamente após a obtenção dos espécimes e leitura de dureza, cor e rugosidade, todos os espécimes foram pesados, colocados em um dessecador contendo sílica gel azul desidratada à temperatura ambiente e pesados diariamente em balança analítica de precisão (Metler Toledo GmbH, Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Switzerland) até a estabilidade dos pesos ($\pm 0,001\text{g}$), obtendo-se assim, a massa inicial seca (M1). Finalizado o período de higienização dos espécimes, os mesmos foram pesados novamente para obtenção da massa úmida (M2). Após a obtenção de M2, os espécimes foram recolocados no dessecador contendo sílica gel azul desidratada, pesados diariamente até a estabilidade na leitura dos pesos ($\pm 0,001\text{g}$), obtendo-se assim, a massa final seca (M3).

Ao final, a porcentagem de absorção de cada corpo de prova foi calculada seguindo a fórmula (Kazanji; Watkinson, 1988): % de absorção = $(M2 - M3)/M1 \times 100$.

3. Avaliação da superfície dos corpos de prova de silicone após os protocolos de higiene, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A análise da superfície dos espécimes foi realizada com auxílio do Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM -6610 LV, JEOL USA, Inc., Peabody, MA, Boston, USA). A análise por meio da Espectroscopia por Energia Dispersiva foi realizada concomitantemente à leitura de MEV, com um detector de raios-X acoplado ao equipamento descrito acima, a fim de se detectar o tipo e a quantidade de cada elemento químico presente nos espécimes de silicone. Para as avaliações superficiais foram utilizados 1 fragmento de 1x1 cm de cada espécime de cada grupo (pigmentação e protocolo de higiene), totalizando a análise de 24 amostras, a fim de detectar diferenças superficiais após os protocolos de higienização.

4. Avaliação laboratorial da ação antimicrobiana dos diferentes protocolos de higienização

4.1 Delineamento experimental

A análise foi conduzida por meio da formação de biofilmes específicos em espécimes confeccionados com os materiais MDX 4-4210 e Bio-Skin pigmentados por meio da adição de pó de maquiagem, uma vez que esta pigmentação é o método mais empregado na prática

clínica. Das espécies de micro-organismos identificadas pelo método de hibridação de DNA *Checkerboard*, foram selecionadas aquelas representativas de espécies Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, importantes na formação do biofilme, sua manutenção e virulência.

A quantidade total de espécimes utilizada nessa etapa foi definida de acordo com o seguinte delineamento experimental: 12 corpos de prova x 4 protocolos de higiene x 1 pigmentação x 6 micro-organismos x 2 materiais, totalizando assim, 576 corpos de prova, sendo 288 com cada material. As cepas selecionadas, procedência e características estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Espécies, procedência e características morfotintoriais dos micro-organismos selecionados para avaliação da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene.

Micro-organismos	Cepa	Características morfotintoriais
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC® 25175	Coco Gram-positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923	Coco Gram-positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853	Bacilo Gram-negativo
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	Bacilo Gram-negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212	Coco Gram-positivo
<i>Candida glabrata</i>	ATCC® 2001	Levedura

* ATCC - American Type Culture Collection

4.2 Obtenção dos corpos de prova e formação dos grupos de higienização

Os corpos de prova foram obtidos, segundo a descrição mencionada no item 2.2 e especificado no item 2.3.2. Em seguida, foram distribuídos, aleatoriamente, nos grupos de higiene, sendo:

- ✓ A: Imersão em água destilada – controle;
- ✓ Cl0,12%: Imersão em gluconato de clorexidina a 0,12%;
- ✓ Rc10%: Imersão em solução de *Ricinus communis* a 10%;
- ✓ E: Escovação com escova macia e sabão neutro.

4.3 Esterilização dos corpos de prova

Após a formação dos grupos, os corpos de prova foram colocados no interior de um Becker contendo água destilada esterilizada para, então, serem submetidos à esterilização por meio de irradiação em forno de micro-ondas (Panasonic, modelo Perfect, 127V; 800W;

2450MHz) (Figura 33), programado a 650W, durante 6 minutos de exposição (Silva *et al.*, 2006). Este procedimento teve como objetivo eliminar micro-organismos do meio ambiente.

Figura 33 – A: Vista externa do aparelho de micro-ondas. B: Grupo de espécimes no Becker contendo água, no interior do micro-ondas.

4.4 Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados para a preparação dos inóculos microbianos, posterior contaminação dos corpos de prova e semeadura, encontram-se listados abaixo.

4.4.1 Mueller Hinton Broth (HB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação dos inóculos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, usados na contaminação dos corpos de prova. Para cada 21,0 g do meio de cultura desidratado *Mueller Hinton Broth* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.2 Mueller Hinton Ágar (MHA)

Este meio de cultura foi utilizado para o preparo das placas ágar para semeadura da suspensão obtida após a instituição dos protocolos de higiene nos corpos de prova contaminados com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Para cada 38,0 g do meio de cultura desidratado *Mueller Hinton Ágar* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.3 Sabourand Dextrose Broth (SDB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo de *C. glabrata*, usado na contaminação dos corpos de prova. Para cada 30,0 g do meio de cultura desidratado

Sabourand Dextrose Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.4 *Sabourand Dextrose Ágar (SDA)*

Este meio de cultura foi utilizado para o preparo das placas ágar para a semeadura da suspensão obtida após a instituição dos protocolos de higiene nos corpos de prova contaminados com *C. glabrata*. Para cada 65,0 g do meio de cultura desidratado *Sabourand Dextrose Ágar* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.5 *Brain-Heart Infusion Broth (BHI)*

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo de *S. mutans* usado na contaminação dos corpos de prova. Para cada 37,0 g do meio de cultura desidratado *Brain-Heart Infusion Broth* (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.6 *Mitis Salivarius Ágar Base (MS)*

Este meio de cultura foi utilizado para o preparo das placas ágar para a semeadura da suspensão obtida após a instituição dos protocolos de higiene nos corpos de prova contaminados com *S. mutans*. Para cada 90,0 g do meio de cultura desidratado *Mitis Salivarius Ágar Base* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes. Após o resfriamento do meio de cultura a uma temperatura entre 50-55°C, 20% de sacarose foi adicionada.

4.4.7 *Tryptone Soya Broth (TSB)*

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo de *E. faecalis* usado na contaminação dos corpos de prova. Para cada 30,0 g do meio de cultura desidratado *Tryptone Soya Broth* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.8 *Tryptone Soya Agar (TSA)*

Este meio de cultura foi utilizado para o preparo das placas ágar para a semeadura da suspensão obtida após a instituição dos protocolos de higiene nos corpos de prova contaminados com *E. faecalis*. Para cada 40,0 g do meio de cultura desidratado *Tryptone Soya Ágar* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.4.9 *Lethen Broth (LB)*

Este meio de cultura foi utilizado para a avaliação da esterilidade (controle negativo) e confirmação da contaminação, por “submersão”, dos corpos de prova com os micro-organismos estudados (controle positivo). Para cada 25,7 g do meio de cultura desidratado *Lethen Broth* (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, India) foram adicionados 1000,0 mL de água destilada. O meio de cultura foi distribuído em alíquotas aproximadas de 10,0 mL para cada tubo de ensaio, que, posteriormente foram tamponados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções dos fabricantes.

4.5 Padronização do inóculos microbianos

Para a padronização dos inóculos, os seis micro-organismos selecionados foram reativados nos respectivos meios de cultura e incubados por 24 horas, a 37°C (Incubadora Shaker, Modelo CE-320, Cienlab, Campinas, São Paulo, Brasil). Posteriormente, uma colônia de cada micro-organismo foi repicada no respectivo caldo e o crescimento ocorreu em um período entre 16 e 22 horas (fase de crescimento exponencial; Figura 34) em estufa bacteriológica a 37°C.

Figura 34 – Curva representativa da fase de crescimento exponencial.

Em seguida, os tubos de ensaio contendo o inóculo microbiano e seu respectivo caldo foram centrifugados e o *pellet* celular obtido foi lavado duas vezes com 10 ml de solução PBS. A padronização para obtenção de 1×10^8 células/mL foi feita em PBS, através da avaliação da turvação da suspensão em Espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Inc, United States), com comprimento de onda de 625 nm e com as leituras de absorbância apresentadas na tabela 4. Cabe ressaltar que as absorbâncias para cada micro-organismo foi definida a partir de uma curva de crescimento (Apêndice C) feita no Laboratório de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Tabela 4 – Leituras de absorbância para cada micro-organismo avaliado para obtenção de 1×10^8 células.

Espécie microbiana	Intervalo de Absorbância
<i>Streptococcus mutans</i>	0,075 a 0,080
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,110 a 0,115
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,140 a 0,150
<i>Escherichia coli</i>	0,115 a 0,120
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,090 a 0,095

Para a *C. glabrata*, a determinação foi feita por meio da contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio comum, através do método de contagem celular desenvolvido por Lee *et al.* (1981). Uma lamínula foi fixada à Câmara de Neubauer e com o auxílio de uma pipeta automática, 1 mL da suspensão celular foi colocada no espaço existente entre a câmara de Neubauer e a lamínula, de forma que, por diferença de capilaridade, a alíquota coletada se transferisse para a câmara, preenchendo toda a área. Em seguida, a câmara de Neubauer foi posicionada no microscópio para contagem celular, considerando os quatro quadriláteros maiores localizados nas laterais da câmara. Foi considerado número celular suficiente quando a contagem foi superior a 160 células. Em seguida, foi realizada a inoculação do meio de cultura, com 1×10^6 células / mL de cada micro-organismo, para posterior contaminação dos corpos de prova e formação do biofilme.

4.6 Contaminação dos corpos de prova e formação do biofilme

Assepticamente, em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil), os corpos de prova previamente esterilizados foram distribuídos em placas para

cultura celular de 12 poços (Figura 35A). Cada poço recebeu 2 mL de meio de cultura inoculado (Figura 35B), com exceção de um poço, o qual recebeu 2 mL de meio de cultura esterilizado (grupo controle negativo microbiológico: confirmação da esterilidade dos corpos de prova).

Figura 35 – A: Distribuição dos corpos de prova previamente esterilizados em placas para cultura celular de 12 poços. B: Adição do meio de cultura inoculado aos poços da placa de cultura celular.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker, Mod.-CE-320, Cienlab, Campinas, São Paulo, Brasil), por 1 h e 30 minutos sob agitação de 75 rpm (Figura 37), para aderência dos micro-organismos aos corpos de prova. Após período de incubação, cada corpo de prova e poço foi lavado com solução PBS para a remoção dos micro-organismos fracamente aderidos. A seguir, 2 mL de meio de cultura esterilizado foram inseridos em cada poço e as placas foram novamente incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C sob agitação de 75 rpm por 48 h, para a maturação do biofilme (Marra *et al.*, 2012).

Figura 36 – A: Estufa bacteriológica utilizada na incubação dos corpos de prova. B: Incubação dos corpos de prova contaminados.

4.6 Aplicação dos métodos de higienização

Após período de incubação para maturação do biofilme, os métodos de higienização foram instituídos. Para os grupos de higienização por imersão (A, Cl0,12% e Rc10%), em câmara de fluxo laminar, cada corpo de prova foi transferido, com o auxílio de uma pinça

esterilizada da placa de cultura celular contaminada para tubos de polietileno com tampa rosqueável estéreis (Tubos Falcon de 50 mL, LMP Produtos e Equipamentos para Laboratório, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 37), contendo 8 mL da solução higienizadora, sendo: água destilada esterilizada (controle positivo), gluconato de clorexidina a 0,12% ou solução de *Ricinus communis* a 10%.

Figura 37 – Imersão individual dos corpos de prova nas soluções higienizadoras.

Após 20 minutos de imersão, cada corpo de prova foi removido de seu respectivo tubo falcon com o auxílio de uma pinça esterilizada e, enxaguado por quatro vezes em água destilada esterilizada, para eliminação de resíduos das soluções higienizadoras. Finalizada a lavagem, cada corpo de prova foi colocado em um tubo de ensaio de vidro contendo 10 mL do meio de cultura *Lethen* esterilizado levados em cuba de ultrassom (cuba de ultrassom AltSonic Clean 9CA, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), sob agitação por 20 minutos, para desprendimento das células microbianas que não foram eliminadas pelas soluções de higiene para o meio *Lethen* (Figura 38).

Figura 38 – Tubos de ensaio contendo os corpos de prova imersos em meio de cultura *Lethen* mantidos em Cuba Ultrassônica sob vibração, por 20 minutos.

Para o grupo de higienização por escovação (E), após período de incubação para maturação do biofilme, em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de uma pinça esterilizada, cada corpo de prova foi removido da placa de cultura celular contaminada e suas superfícies (planas e laterais) foram escovadas por 20 segundos cada por um pesquisador

previamente calibrado e calçado de luvas cirúrgicas estéreis, totalizando 60 segundos de escovação (Figura 39) com escova dental previamente esterilizada (TEK macia) e sabão neutro. Finalizada a escovação, cada corpo de prova foi enxaguado por quatro vezes em solução PBS esterilizada, para eliminação de resíduos do sabão neutro.

Figura 39 – Escovação dos corpos de prova com escova macia e sabão neutro por 60 segundos, sendo 20 segundos em cada superfície plana (2) e 20 segundos na superfície lateral.

Cada corpo de prova foi colocado em tubo de ensaio de vidro contendo 10 mL do meio de cultura *Letheen* esterilizado e levados em cuba de ultrassom (AltSonic Clean 9CA, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), sob agitação por 20 minutos, para desprendimento das células microbianas não eliminadas pela escovação para o meio de cultura.

4.7 Semeadura em meio de cultura

Para a semeadura, a suspensão contida nos tubos de ensaio contendo os corpos de prova e o meio de cultura *Letheen* (Figura 40) foi diluída de forma seriada de 10^0 para 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e semeada em placas de Petri (Figura 40) contendo os meios de cultura seletivos para cada micro-organismo.

Figura 40: A: Suspensão contida nos tubos de ensaio contendo os corpos de prova e o meio de cultura *Letheen*; B: semeadura da suspensão de forma seriada.

Detalhadamente, este procedimento foi realizado da seguinte forma: os tubos de ensaio foram individualmente agitados em um agitador mecânico (Phoenix®, AP56, Indústria e Comércio Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) e uma alíquota de 50 µL da suspensão sem diluição (10^0) (Figura 40A) foi semeada em um quadrante da placa de Petri (Figura 40B) contendo meio de cultura específico para cada micro-organismo. A seguir, outra alíquota de 50 µL da solução foi transferida para um microtubo esterilizado, contendo 225 µL de PBS esterilizado (Figura 41), obtendo-se uma suspensão diluída (10^{-1}), a qual foi semeada. Este procedimento foi realizado mais 2 vezes, para obtenção das diluições de 10^{-2} e 10^{-3} , as quais foram semeadas nos quadrantes restantes da placa de Petri. As placas semeadas foram incubadas por 24 horas a 37°C, em estufa microbiológica (Figura 42). Para o *S. mutans* e *E. faecalis*, a incubação foi realizada em baixa concentração de oxigênio (microaerofilia), em jarras apropriadas (Jarra Anaeróbia Acrílica, 3,5 L, Permution, E.J. Krieger & Cia. Ltda., Curitiba, Pr, Brasil) (Figura 42).

Figura 41 – Transferência de uma alíquota de 50 µL da solução para um microtubo esterilizado, contendo 225 µL de PBS esterilizado.

Figura 42 – Placas de Petri semeadas e incubadas em microaerofilia.

Após o período de incubação, o número de colônias de cada placa de Petri foi contado com o auxílio de uma lupa microscópica (Mod. SQZ-DS4, Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil). Para o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC/mL), para cada micro-organismo analisado, foi considerada a diluição em que o número de colônias variou entre 0 e

300 e utilizou-se a seguinte fórmula: UFC/mL: número de colônias $\times 10^n / q$, sendo: n o valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3) e q à quantidade em mL, pipetada para cada diluição quando das sementeiras nas placas (0,05). O resultado obtido ao final foi multiplicado por 10 para obtenção da quantidade de UFC pelo volume total. Por fim, os tubos de ensaio contendo os corpos de prova imersos em meio de cultura *Lethen* foram incubados a 37°C por 28 dias em estufa (Figura 43) e a turvação do meio foi avaliada para verificação da presença ou ausência do crescimento de micro-organismos. O grupo controle positivo teve como objetivo confirmar a contaminação com os micro-organismos, enquanto que o controle negativo foi utilizado para comprovar as condições de assepsia do experimento (Figura 44).

Figura 43 – A: Incubação dos tubos de ensaio em estufa com temperatura controlada ($\pm 37^\circ\text{C}$) por 28 dias para analisar a presença ou ausência de turvação do meio; B: Incubação em microaerofilia.

Figura 44 – À esquerda, turvação negativa (controle negativo) e à direita, turvação positiva (controle positivo).

5. Análise dos dados

Os dados da Identificação (*in vivo*) de micro-organismos presentes em biofilme de próteses maxilofaciais e tecidos adjacentes, pelo método de hibridação de DNA *Checkerboard* foram apresentados em gráficos e uma análise descritiva foi realizada. Para

comparação da quantidade de micro-organismos presentes nas próteses e tecidos adjacentes foi empregado o Teste de Wilcoxon (Signed-rank Test) ($p < 0,05$).

Para análise do efeito dos protocolos de higiene sobre as propriedades físicas e mecânicas dos silicones foram consideradas:

- Variáveis de resposta quantitativa:

- a) Alteração de cor;
- b) Dureza Shore A;
- c) Rugosidade de superfície;
- d) Absorção de líquido.

- Variável de resposta qualitativa:

- a) Análise da superfície (MEV) e características de composição (EDS).

- Fatores de variação:

- a) Materiais em dois níveis (MDX4-4210 e Bio Skin – experimental);
- b) Pigmentação em quatro níveis (sem pigmentação/controle, adição de pó de maquiagem, adição de opacificador e adição de pó de maquiagem + opacificador);
- c) Protocolos de higiene em três níveis (imersão em água + escovação, imersão em gluconato de clorexidina a 0,12% + escovação e imersão em *Ricinus communis* a 10% + escovação).

Para as variáveis alteração de cor, dureza Shore A e rugosidade superficial, foi verificada a distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilks) e homogênea (Teste de Levene) dos dados, o que permitiu a utilização da Análise de variância (Three-way ANOVA) e Teste Complementar de Tukey para comparação das médias. Para a análise estatística da variável dureza Shore A, os resultados foram analisados em módulo, ou seja, em valores absolutos, desconsiderando o sinal positivo ou negativo. Para a variável absorção de líquidos, foi verificada a distribuição não normal (Teste de Shapiro-Wilks) dos dados, sendo aplicado então, o Teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$, indicado para comparações múltiplas de amostras independentes.

Para análise dos dados da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene sobre os micro-organismos identificados pela técnica de hibridação de DNA *Checkerboard*, foram consideradas:

- Variáveis de resposta quantitativa:

- a) Contagem de Unidades Formadora de Colônias (UFC);

- Fatores de variação:

- a) Materiais em dois níveis (MDX4-4210 e Bio Skin – experimental);

b) Protocolos de higiene em quatro níveis (imersão em água; imersão em gluconato de clorexidina a 0,12%; imersão em *Ricinus communis* a 10%; escovação com sabão neutro). A contagem de UFC foi realizada somente com o grupo de pigmentação com pó de maquiagem. Verificada a distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilks) e homogênea (Teste de Levene) dos dados obtidos, empregou-se Análise de variância (Two-way ANOVA) e Teste Complementar de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias.

Todos os testes estatísticos foram realizados por um pesquisador cego aos grupos experimentais utilizando o software SPSS Statistics 22.0 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA), respeitando-se um nível de significância de 5%.

Resultados

1. Identificação (*in vivo*) de micro-organismos presentes em biofilme de próteses maxilofaciais e tecidos adjacentes, pelo método de hibridação de DNA *Checkerboard*

Para identificação dos micro-organismos presentes no biofilme das próteses e tecidos adjacentes, participaram do estudo 43 indivíduos. As características sócio-demográficas dos participantes estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Características sócio-demográficas dos participantes da pesquisa.

Gênero	N	Média de idade	N
Masculino	27	Masculino	52
Feminino	16	Feminino	54
Escolaridade	N	Profissão	N
Analfabeto	6	Aposentado	14
1º grau incompleto	12	Empregado	21
1º grau completo	9	Estudante	2
2º grau incompleto	6	Dona de Casa	5
2º grau completo	9	Desempregado	1
Superior incompleto	0		
Superior completo	1		

Com relação às características demográficas do estudo, os resultados mostraram que a maioria dos participantes foi do gênero masculino (61,5%), com média etária de 52 anos.

As informações relativas ao tipo de prótese, tipo de lesão, tempo de uso da prótese, material de confecção dos dispositivos protéticos, hábitos de higiene e causa das lesões, estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Tipos de próteses, tipo de lesão, material de confecção, tempo de uso das próteses, hábitos de higiene e causas das lesões.

Tipo de Lesão	N	Material	N
Facial	32	Resina Acrílica	41
Intra-Oral	11	Silicone	2
Tipo de Prótese	N	Hábitos Higiene	N
Auricular	1	Soro Fisiológico	9
Nasal	5	Sabão Neutro	18
Ocular	26	Escova + Dentifrício	8
Obturadora palatina	10	Somente água	5
Obturadora faringea	1	Água Oxigenada	1
Causa da Lesão	N	Nenhum	2
Trauma	23	Tempo de Uso	N
Tumor	17	Menos 1 ano	12
Congênito	3	Mais de 1 ano	31

Com relação aos tipos de próteses dos participantes, a maioria faz uso de próteses faciais (75%), principalmente próteses do tipo ocular (60%), sendo a maioria decorrente de traumas (53%). A maioria das próteses avaliadas era confeccionada em resina acrílica (95%) e, em relação aos hábitos de higiene, o mais utilizado pelos participantes do estudo foi limpeza com sabão neutro (41%).

A técnica de hibridação de DNA *Checkerboard* permitiu a identificação e a quantificação de 38 espécies de micro-organismos presentes em próteses e tecidos adjacentes a elas em 43 participantes. As figuras 45 a 48 ilustram as reações de hibridação das membranas obtidas no presente estudo, sendo cada membrana correspondente à análise de 28 amostras.

Figura 45 - Reação de hibridação das amostras provenientes das próteses e tecidos adjacentes. As linhas verticais representam a posição de amostras e dos controles (10^5 e 10^6 células de cada espécie microbiana), e, as linhas horizontais as sondas das 38 espécies padrão dos micro-organismos avaliados.

Figura 46 - Reação de hibridação das amostras provenientes das próteses e tecidos adjacentes. As linhas verticais representam a posição de amostras e dos controles (10^5 e 10^6 células de cada espécie microbiana), e, as linhas horizontais as sondas das 38 espécies padrão dos micro-organismos avaliados.

Figura 47 - Reação de hibridação das amostras provenientes das próteses e tecidos adjacentes. As linhas verticais representam a posição de amostras e dos controles (10^5 e 10^6 células de cada espécie microbiana), e, as linhas horizontais as sondas das 38 espécies padrão dos micro-organismos avaliados.

Figura 48 - Reação de hibridação das amostras provenientes das próteses e tecidos adjacentes. As linhas verticais representam a posição de amostras e dos controles (10^5 e 10^6 células de cada espécie microbiana), e, as linhas horizontais as sondas das 38 espécies padrão dos micro-organismos avaliados.

A partir da interpretação das membranas, pode-se verificar a presença das 38 espécies de identificação em quase todas as próteses e tecidos adjacentes. As frequências de aparecimento estão apresentadas nas figuras de 49 a 52.

Figura 49 – Frequência de aparecimento dos micro-organismos identificados nas próteses e cavidades nasais.

Por meio da figura 49 pode-se verificar que, de todos os micro-organismos alvo, somente a *C. albicans* foi identificada apenas na cavidade nasal e que *C. tropicalis*, *T. forsythia*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* foram identificados apenas na prótese. *T. denticola* não foi identificado em nenhum dos sítios.

Figura 50 – Frequência de aparecimento dos micro-organismos identificados nas próteses e cavidades palatinas.

Para a cavidade e prótese palatina, pode-se verificar que os 38 micro-organismos alvo foram identificados em ambos os sítios, com exceção do *S. sanguinis*, que foi identificado somente na prótese.

Figura 51 – Frequência de aparecimento dos micro-organismos identificados nas próteses e cavidades oculares.

Por meio da Figura 51, pode-se verificar que todos os micro-organismos foram identificados em 100% das próteses e cavidades oculares.

Figura 52 – Frequência de aparecimento dos micro-organismos identificados na prótese e cavidade auricular.

A Figura 52 mostra que 8 dos micro-organismos alvo foram identificados apenas na prótese e 5 apenas na cavidade. Seis micro-organismos não foram identificados em nenhum dos sítios de coleta. A Tabela 7 mostra a comparação da contagem total (pool) de micro-organismos identificados nas próteses e tecidos adjacentes.

Tabela 7 – Comparação da contagem total (pool) de micro-organismos identificados nas próteses e tecidos adjacentes e significância estatística (*P*). IC: Intervalo de confiança (95%).

Micro-organismos	Prótese		Tecido adjacente		<i>P</i>
	Mediana	IC	Mediana	IC	
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	5,5	3,1 - 4,7	5,4	2,6 - 4,3	0,223
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	0	1,0 - 2,6	0	1,4 - 3,1	0,557
<i>B. fragilis</i>	5,6	2,9 - 4,5	0	1,8 - 3,5	0,024
<i>C. rectus</i>	5,1	2,1 - 3,8	0	1,6 - 3,3	0,209
<i>C. gingivalis</i>	0	1,3 - 3,0	0	1,1 - 2,7	0,34
<i>E. coli</i>	0	1,3 - 3,0	0	1,0 - 2,5	0,295
<i>E. faecalis</i>	5,5	3,2 - 4,7	0	1,6 - 3,3	0,004
<i>F. nucleatum</i>	4,5	1,9 - 3,6	0	1,0 - 2,6	0,057
<i>K. pneumoniae</i>	5,5	2,5 - 4,3	0	1,7 - 3,5	0,149
<i>L. casei</i>	0	1,6 - 3,3	0	1,2 - 2,8	0,52
<i>M. salivarius</i>	5,4	2,7 - 4,4	0	1,4 - 3,1	0,024
<i>P. micros</i>	4,7	1,9 - 3,7	0	1,2 - 2,8	0,115
<i>P. anaerobius</i>	5,1	2,0 - 3,8	0	1,5 - 3,2	0,135
<i>P. gingivalis</i>	0	1,9 - 3,6	5	1,9 - 3,7	0,576
<i>P. intermedia</i>	5,7	3,5 - 5,0	0	1,6 - 3,4	0,002
<i>P. melaninogenica</i>	0	0,9 - 2,4	0	0,4 - 1,8	0,78
<i>P. nigrescens</i>	0	0,6 - 2,0	0	0,6 - 2,1	0,897
<i>P. aeruginosa</i>	0	1,7 - 3,5	5	2,0 - 3,7	0,649
<i>P. putida</i>	5,2	2,2 - 3,9	0	1,1 - 2,7	0,106
<i>S. moorei</i>	0	1,8 - 3,6	4,6	1,9 - 3,6	0,65
<i>S. aureus</i>	0	1,6 - 3,3	0	1,4 - 3,1	0,468
<i>S. pasteurii</i>	0	1,6 - 3,3	0	0,5 - 1,9	0,029
<i>S. constellatus</i>	5,4	2,7 - 4,3	5,4	2,1 - 3,9	0,957
<i>S. gordonii</i>	0	1,7 - 3,4	5,2	2,0 - 3,7	0,564
<i>S. mutans</i>	5,5	2,5 - 4,2	5,1	2,0 - 3,7	0,335
<i>S. mitis</i>	5,7	2,7 - 4,4	5,5	2,2 - 4,0	0,453
<i>S. parasanguinis</i>	5,3	2,0 - 3,8	0	0,9 - 2,5	0,064
<i>S. salivarius</i>	5,5	2,4 - 4,1	5,4	2,4 - 4,1	0,887
<i>S. sanguinis</i>	0	1,2 - 2,8	0	0,3 - 1,7	0,217
<i>S. sobrinus</i>	5,3	2,3 - 4,0	0	1,4 - 3,1	0,116
<i>T. forsythia</i>	0	0,3 - 1,6	0	0,5 - 1,9	0,436
<i>T. denticola</i>	0	0,0 - 0,9	0	0,5 - 1,9	0,14
<i>V. parvula</i>	5,2	2,5 - 4,1	0	1,5 - 3,2	0,23
<i>C. albicans</i>	0	0,5 - 2,0	0	0,6 - 2,1	0,867
<i>C. glabrata</i>	5,3	2,7 - 4,4	4,9	2,0 - 3,7	0,418
<i>C. tropicalis</i>	0	1,0 - 2,6	0	0,4 - 1,8	0,078
<i>C. krusei</i>	0	1,8 - 3,5	5	2,0 - 3,7	0,451
<i>C. dubliniensis</i>	0	1,5 - 3,2	0	1,1 - 2,7	0,819

Nota-se que apenas 5 micro-organismos apresentaram diferença significativa na contagem entre prótese e tecido, sendo que a maior quantidade foi encontrada na prótese.

Considerando a frequência de aparecimento e os fatores de virulência dos micro-organismos identificados, 6 micro-organismos (Tabela 8) representativos de bactéria Gram-positivas e Gram-negativas, bem como de leveduras foram selecionados para análise da atividades antimicrobiana dos protocolos de higiene.

Tabela 8 – Espécies de micro-organismos selecionados para avaliação da ação antimicrobiana dos diferentes protocolos de higiene, procedência e características morfológicas.

Micro-organismos	Cepa	Características morfológicas
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	Coco gram-positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Coco gram-positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bacilo gram-negativo
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Bacilo gram-negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Coco gram-positivo
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001	Levedura

* ATCC - American Type Culture Collection

2. Avaliação do efeito dos protocolos de higiene sobre a alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos

2.1 Alteração de cor

O Apêndice D apresenta os valores de alteração de cor dos materiais em função da pigmentação e dos protocolos de higienização.

A Análise de Variância (Tabela 9) indicou diferença significativa entre os materiais (Bio-Skin: $\mu=1,41\pm0,86$; MDX: $\mu=1,79\pm0,91$), protocolos de higiene (EA: $\mu=1,41\pm0,86$; EC10,12%: $\mu=1,67\pm0,92$; ERc10%: $\mu=1,73\pm0,87$) e pigmentos (GC: $\mu=1,75\pm0,96$; GO: $\mu=1,63\pm0,68$; GP: $\mu=1,67\pm0,85$; GOP: $\mu=1,36\pm1$), sendo as maiores alterações atribuídas ao silicone MDX 4-4210, ao protocolo ERc10% e grupo sem pigmentação (GC). Houve interação entre material x pigmentação ($p=0,00$), onde as menores alterações foram encontradas no silicone Bio-Skin dos grupos GP e GPO (Tabela 10).

Tabela 9 – Análise de Variância dos dados de alteração de cor. *Significância estatística

Fatores de variação	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrados Médios	F	P
Material (M)	8,449	1	8,449	13,407	,000*
Pigmento (P)	5,115	3	1,705	2,706	,046*
Protocolo (Pr)	4,697	2	2,349	3,727	,026*
Material * Pigmento	22,096	3	7,365	11,688	,000*
Material * Protocolo	3,564	2	1,782	2,828	,061
Pigmento * Protocolo	5,178	6	,863	1,370	,228
M * P * Pr	5,793	6	,965	1,532	,169
Erro	136,116	216	,630		
Total	810,506	240			

Tabela 10 - Comparação das médias (DP) da alteração de cor (ΔE) na interação material x pigmentação.

	GC	GP	GO	GPO
MDX	1,61±0,78 ^{Aa}	1,89±1,02 ^{Aa}	1,63±0,8 ^{Aa}	2,03±1,1 ^{Aa}
Bio-Skin	1,89±1,11 ^{Aa}	1,45±0,58 ^{Ab}	1,62±0,56 ^{Aa}	0,7±0,34 ^{Bb}

Letras iguais = igualdade estatística. Letra maiúscula = comparação entre colunas da mesma linha; Letra minúscula = comparação entre linhas da mesma coluna.

2.2 Dureza Shore A

Os Apêndices E e F apresentam os valores de dureza Shore A dos espécimes confeccionados com os silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin, respectivamente, em função da pigmentação e protocolos de higiene. A Análise de Variância não identificou diferença significativa na variação da dureza dos materiais (MDX: $\mu=2,4\pm1,62$; Bio-Skin: $\mu=2,16\pm1,42$), mas houve diferença significativa entre os protocolos de higiene e pigmentação (Tabela 11). O protocolo EA ($\mu=2,65\pm1,66$) provocou a maior variação e ECI0,12% ($\mu=1,95\pm1,34$) a menor, seguido pelo ERc10% ($\mu=2,22\pm1,5$). Quanto ao fator pigmentação, as maiores variações foram encontradas no grupo GC ($\mu=2,7\pm1,62$) e as menores no grupo GO ($\mu=1,86\pm1,10$). Os grupos GP e GPO apresentaram valores intermediários (GP: $\mu=2,33\pm1,65$; GPO: $\mu=2,21\pm1,6$). Houve interação entre protocolo de higiene x material ($p=0,031$; Tabela 12), podendo-se verificar que o silicone MDX 4-4210 apresentou menor variação da dureza em função do protocolo ECI0,12%, enquanto o Bio-Skin não sofreu variação da dureza em função dos protocolos (Tabela 12). A variação da dureza entre os dois silicones foi diferente somente quando submetidos ao protocolo ERc10%.

Tabela 11 – Análise de Variância dos dados de dureza Shore A. *Significância estatística.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrados Médios	F	P
Material (M)	3,197	1	3,197	1,573	,211
Pigmento (P)	21,136	3	7,045	3,467	,017*
Protocolo (Pr)	20,126	2	10,063	4,952	,008*
Material * Pigmento	8,852	3	2,951	1,452	,229
Material * Protocolo	14,345	2	7,173	3,530	,031*
Pigmento * Protocolo	20,473	6	3,412	1,679	,127
M * P * Pr	25,095	6	4,182	2,058	,059
Erro	438,929	216	2,032		
Total	1790,210	240			

Tabela 12 - Comparação das médias (DP) de variação da dureza Shore A (em unidades Shore A) na interação protocolo de higiene x material.

	EA	ERc10%	EC10,12%
MDX	2,95±1,82 ^{Aa}	2,5±1,6 ^{Aa}	1,72±1,15 ^{Ba}
Bio-Skin	2,35±1,44 ^{Aa}	1,95±1,32 ^{Ab}	2,18±1,5 ^{Aa}

Letras iguais = igualdade estatística. Letra maiúscula = comparação entre colunas da mesma linha; Letra minúscula = comparação entre linhas da mesma coluna.

2.3 Rugosidade Superficial

Os Apêndices G e H apresentam os valores de rugosidade superficial dos espécimes confeccionados com os silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin, respectivamente, em função da pigmentação e protocolos de higiene.

A Análise de Variância (Tabela 13) indicou diferença significativa somente entre os silicones avaliados (Bio-Skin: $\mu=-0,22\pm0,67$; MDX: $\mu=-0,04\pm0,19$), sendo que o silicone MDX 4-4210 apresentou a menor variação de rugosidade e os dois materiais apresentaram diminuição da rugosidade, a qual não foi influenciada pelos protocolos de higiene (EA: $\mu=-0,08\pm0,46$; EC10,12%: $\mu=-0,18\pm0,56$; ERc10%: $\mu=-0,14\pm0,47$), pigmentos (GC: $\mu=-0,16\pm0,64$; GO: $\mu=-0,18\pm0,59$; GP: $\mu=-0,02\pm0,30$; GPO: $\mu=-0,17\pm0,37$), ou interação entre os fatores analisados (Tabela 14).

Tabela 13 – Análise de Variância dos dados de rugosidade superficial. *Significância estatística.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	G.L.	Quadrados Médios	F	P
Material (M)	2,048	1	2,048	8,512	,004*
Pigmento(P)	1,018	3	,339	1,411	,241
Protocolo de Higiene (Pr)	,428	2	,214	,889	,413
Material * Pigmento	,398	3	,133	,551	,648
Material * Protocolo	,180	2	,090	,373	,689
Pigmento * Prrotocolo	2,417	6	,403	1,675	,128
M * P* Pr	1,993	6	,332	1,381	,224
Erro	51,966	216	,241		
Total	64,856	240	2,048		

Tabela 14 – Média (DP) de rugosidade superficial (μm) dos silicones, grupos de pigmentação e protocolos de higiene.

	EA				ERc10%				EC10,12%			
	GC	GP	GO	GPO	GC	GP	GO	GPO	GC	GP	GO	GPO
MDX	-0,07	0,01	-0,07	0,06	-0,1	0,02	-0,02	-0,17	-0,15	0,03	-0,13	0,03
	0,26	0,12	0,25	0,18	0,19	0,12	0,21	0,18	0,09	0,13	0,25	0,24
Bio-Skin	-0,14	0,02	0,08	-0,53	-0,3	0,12	-0,21	-0,34	-0,32	-0,1	-0,74	-0,1
	1	0,25	0,2	0,59	0,76	0,53	0,88	0,31	0,99	0,45	0,94	0,28

2.4 Absorção de líquidos

Os Apêndices I e J apresentam os valores das massas obtidas dos silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin nos grupos de pigmentação e protocolos de higiene, respectivamente.

A Tabela 15 apresenta a porcentagem de absorção de líquido dos dois materiais, grupos de pigmentação e protocolos de higiene e a Figura 53 apresenta a comparação da mediana e intervalo de confiança (IC).

Tabela 15 – Porcentagem de absorção de líquido (%) dos silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin dos grupos de pigmentação e diferentes protocolos de higienização, ao final do período experimental.

	EA				ERc10%				EC10,12%			
	GC	GP	GO	GPO	GC	GP	GO	GPO	GC	GP	GO	GPO
MDX 4-4210	0,04	0,04	-0,02	0,04	-0,06	0,02	0,41	-0,05	-1,6	0,34	0,22	0,19
	0,12	0,04	-0,02	-0,04	0,04	0,1	-0,41	0,01	0,37	0,23	0,24	0,35
	0,02	0,06	0,04	0,02	0,05	0,11	0,06	0,08	0,33	0,29	0,28	0,36
	0,14	0,06	0,05	-0,02	1,31	0,52	0,08	0,04	0,31	0,19	0,22	0,43
	0,12	0,06	0,02	-0,07	-1,01	-0,34	1,92	-0,91	0,19	0,29	0,04	-0,56
	0,09	0,06	-0,02	0,02	0	0,12	-0,19	0,07	0,31	0,28	0,27	-0,91
	0,07	0,13	0	-0,08	0,04	0,04	0,1	0,09	0,34	0,42	0,16	0,29
	-0,02	0,13	-0,04	0	0,02	0,11	-0,04	0,08	0,32	0,22	0,27	0,37
	0,15	0,13	0,06	-0,81	0,04	0,06	-1,07	0,13	0,3	0,27	0,27	0,33
	0,08	-0,04	-0,04	0,82	0,08	0,02	0,1	0,02	0,28	0,24	0,28	0,28
Bio-Skin	0,23	0,17	1,89	0,29	0,18	0,36	0,25	0,25	0,32	0,39	0,48	0,42
	0,03	0,2	1,46	0,38	0,14	0,25	0,26	0,16	0,33	0,42	1,12	0,42
	0,77	0,15	1,26	0,4	0,2	0,14	0,24	0,16	2,11	0,42	0,5	0,37
	2,33	0,28	0,49	0,43	0,12	0,24	0,21	0,18	0,35	0,47	0,72	0,25
	-0,45	0,18	0,72	0,18	0,16	0,24	0,26	0,15	-0,2	0,45	0,08	-0,59
	-0,95	0,21	1,38	0,4	0,14	0,19	0,34	0,28	-0,2	-0,53	0,36	0,32
	0,69	0,03	1,55	0,27	0,18	0,12	0,33	0,23	-0,8	-0,36	0,01	0,93
	0,68	0,24	1,75	0,36	0,27	0,2	0,48	0,21	-0,6	0,39	1,08	0,09
	0,77	0,11	0,81	0,32	0,23	0,15	2,8	0,18	-0,2	0,36	1,65	0,42
	0,7	0,2	0,71	0,18	0,15	0,1	-2,1	0,3	-0,4	-0,39	0,34	0,4

Figura 53 – Mediana (IC) para a absorção de líquido (%) dos silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin, após pigmentação e diferentes protocolos de higienização.

A porcentagem de absorção de líquidos do silicone MDX 4-4210 não foi influenciada pela pigmentação ou protocolos de higienização. Para o Bio-Skin, a porcentagem de absorção foi maior nos grupos GC e GO quando submetidos ao protocolo EA. Pelo gráfico, nota-se que houve uma interação entre pigmento e protocolo de higiene, onde para o silicone MDX, a absorção foi maior quando submetidos ao protocolo EC10,12% e para o Bio-Skin, houve uma maior porcentagem de absorção nos grupo GC e GO associados à escovação e imersão em água e nos grupos GP e GPO associado ao protocolo EC10,12%.

3. Avaliação da superfície dos corpos de prova de silicone após o protocolo de higiene proposto por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As figuras abaixo (54 a 77) apresentam as informações obtidas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) dos silicones MDX 4-4210 e Bio-Skin grupos de pigmentação, após protocolo de higienização (imersão + escovação).

Figura 54 – Silicone MDX 4-4210, grupo GC (sem pigmento, controle), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 55 – Silicone MDX 4-4210, grupo GC (sem pigmento, controle), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Figura 56 – Silicone MDX 4-4210, grupo GC (sem pigmento, controle), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Elemento	Porcentagem%
C	28.37
O	31.52
Mg	0.15
Si	39.96
Total:	100.00

Figura 57 – Silicone MDX 4-4210, grupo GP (pó de maquiagem), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Elemento	Porcentagem%
C	28.86
O	30.99
Mg	0.11
Si	39.96
Ca	0.08
Total:	100.00

Figura 58 – Silicone MDX 4-4210, grupo GP (pó de maquiagem), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Figura 59 – Silicone MDX 4-4210, grupo GP (pó de maquiagem), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Figura 60 – Silicone MDX 4-4210, grupo GO (opacificador), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 61 – Silicone MDX 4-4210, grupo GO (opacificador), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

62 – Silicone MDX 4-4210, grupo GO (opacificador), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Figura 63 – Silicone MDX 4-4210, grupo GPO (pó de maquiagem + opacificador), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 64 – Silicone MDX 4-4210, grupo GPO (pó de maquiagem + opacificador), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Figura 65 – Silicone MDX 4-4210, grupo GPO (pó de maquiagem + opacificador), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Figura 66 – Silicone Bio-Skin, grupo GC (sem pigmento, controle), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 67 – Silicone Bio-Skin, grupo GC (sem pigmento, controle), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Figura 68 – Silicone Bio-Skin, grupo GC (sem pigmento, controle), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Figura 69 – Silicone Bio-Skin, grupo GP (pó de maquiagem), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 70 – Silicone, grupo GP (pó de maquiagem), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Figura 71 – Silicone Bio-Skin, grupo GP (pó de maquiagem), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Figura 72 – Silicone Bio-Skin, grupo GO (opacificador), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 73 – Silicone Bio-Skin, grupo GO (opacificador), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Figura 74 – Silicone Bio-Skin, grupo GO (opacificador), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

Figura 75 – Silicone Bio-Skin, grupo GPO (pó de maquiagem + opacificador), após imersão em clorexidina a 0,12% e escovação.

Figura 76 – Silicone Bio-Skin, grupo GPO (pó de maquiagem + opacificador), após imersão em *Ricinus communis* a 10% e escovação.

Elemento	Porcentagem %
C	25.36
O	32.20
Mg	0.18
Al	0.26
Si	41.25
Fe	0.36
Ba	0.39
Total:	100.00

Figura 77 – Silicone Bio-Skin, grupo GPO (pó de maquiagem + opacificador), após imersão em água destilada (controle) e escovação.

As análises das imagens de MEV e dados obtidos por meio do EDS demonstraram que, de maneira geral, não houve alteração na composição dos silicones avaliados após imersão nas soluções higienizadoras e que, mesmo após diferentes protocolos de higienização, a composição dos mesmos mantiveram-se estáveis, predominando a presença de carbono, oxigênio e silício e, nos grupos pigmentados por meio da adição de opacificador, pode-se comprovar a presença do bário e que o mesmo integrou-se na cadeia dos silicones. Nota-se também, que as superfícies dos silicones avaliados são bem distintas, sendo a do silicone experimental mais descontínua, com irregularidades de superfície, o que pode explicar os maiores valores de rugosidade superficial para o silicone experimental.

4. Avaliação da ação antimicrobiana dos protocolos de higiene sobre os micro-organismos identificados pela técnica de hibridação de DNA *Checkerboard*

Após análise das membranas obtidas pela técnica de hibridação de DNA *Checkerboard*, foram selecionados os micro-organismos apresentados na tabela 8, sendo eles *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*.

A Tabela 16 apresenta os resultados da turvação do meio de cultura (*Letheen*) dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após aplicação dos protocolos de higienização e incubação. Sinal negativo (-) indica ausência de turvação e consequentemente eficácia antimicrobiana das soluções. Sinal positivo (+) indica crescimento de micro-organismo.

Tabela 16 – Turvação do meio de cultura dos tubos de ensaio contendo os corpos de prova após protocolo de higienização e incubação.

Micro-organismos/grupos	<i>C. glabrata</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
Controle negativo	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+
A	+	+	+	+	+	+
Rc10%	+	+	+	+	+	+
CI0,12%	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+

Os sinais (-) do controle negativo indicam que o procedimento de esterilização dos corpos de prova em micro-ondas foi eficiente uma vez que não houve desenvolvimento de micro-organismos. Os sinais (+) do controle positivo indicam que houve formação de biofilme nos espécimes. Os sinais (+) dos grupos A, Rc10%, CI0,12% e E indicam que nenhum dos protocolos de higienização foi 100% eficaz.

Os Apêndices K e L apresentam as contagens de UFC/10 mL (em log10) após a exposição dos silicones MDX4-4210 e Bio-Skin aos protocolos de higiene, respectivamente. Os Apêndices M, N, O, P, Q e R apresentam os resultados das análises estatísticas realizadas para cada micro-organismo, considerando os diferentes protocolos de higiene e os materiais avaliados.

A comparação das médias e desvios-padrão da interação entre material x protocolos de higiene, para todos os micro-organismos, encontram-se na Tabela 17, exceto para os micro-organismos *E. faecalis* e *S. mutans*, cuja comparação das médias (DP) dos fatores material e protocolos de higiene isolados, encontra-se nas Figuras 78 e 79, respectivamente.

Tabela 17 – Comparação das médias (DP) das UFC/espécime, para cada micro-organismo tendo como fatores de variação higiene X materiais. P: significância estatística.

Micro-organismo	Material	Protocolos de higiene				P
		A	Rc10%	Cl0,12%	E	
<i>C. glabrata</i>	MDX	5,14±0,81 ^{Aa}	4,12±0,51 ^{Aa}	0,68±1,02 ^{Ab}	2,89±0,68 ^{Ac}	0,002
	Bio-Skin	5,30±0,42 ^{Aa}	4,91±0,36 ^{Aa}	3,11±1,62 ^{Bb}	4,56±0,97 ^{Ba}	
<i>S. aureus</i>	MDX	5,50±0,24 ^{Aa}	4,75±0,2 ^{Aa}	1,04±1,34 ^{Ab}	3,62±0,4 ^{Ac}	0,000
	Bio-Skin	5,52±0,27 ^{Aa}	5,7±0,28 ^{Bab}	4,60±1,81 ^{Bb}	5,4±0,47 ^{Aab}	
<i>P. aeruginosa</i>	MDX	6,17±0,80 ^{Aa}	4,97±0,57 ^{Aa}	0,70±1,09 ^{Ab}	5,49±0,24 ^{Aa}	0,001
	Bio-Skin	5,89±1,04 ^{Aa}	4,94±0,76 ^{Aa}	2,55±1,72 ^{Bb}	4,77±0,6B ^{Aa}	
<i>E. coli</i>	MDX	5,52±0,26 ^{Aa}	4,83±0,19 ^{Aa}	0,0 ^{Ac}	3,78±0,71 ^{Ab}	0,001
	Bio-Skin	5,11±0,43 ^{Aa}	4,35±0,31 ^{Aab}	1,09±1,3 ^{Bc}	3,72±0,61 ^{Ab}	

Letras iguais indicam igualdade estatística; Letras maiúsculas: comparação entre linhas; Letras minúsculas: comparação entre colunas. A análise não compara os micro-organismos entre si.

O silicone MDX 4-4210, quando comparado ao Bio-Skin, apresentou menor contagem de UFC de *C. glabrata* quando exposto ao protocolo Cl0,12% e E. Para o MDX, a Cl 0,12% e E promoveram redução significativa na contagem de UFC quando comparados ao protocolo A e RC10%. Para o Bio-Skin, a redução foi significativa com o protocolo Cl 0,12% enquanto os demais não apresentaram diferença entre si.

Para *S. aureus*, houve redução significativa na contagem de UFC do MDX em relação ao Bio-Skin, quando expostos ao Rc10% e Cl0,12%. Para ambos os materiais a clorexidina a 0,12% foi a mais eficiente.

Para *P. aeruginosa*, a contagem de UFC do MDX foi menor que a do Bio-Skin quando expostos ao protocolo com Cl0,12%, o qual foi o mais eficaz quando comparado com os outros. A contagem de UFC de *E. coli*, seguiu o mesmo comportamento, com exceção de que a escovação promoveu redução significativa da contagem de UFC quando comparada à água e RC10%, os quais não apresentaram diferença entre si.

Figura 78 - Comparação das médias (DP) de UFC (Log10) de *E. faecalis* para materiais e protocolos de higiene. Cores iguais indicam igualdade estatística.

Para *E. faecalis* houve diferença entre os materiais com menor contagem de UFC para o MDX e, para ambos os materiais, a clorexidina foi a solução mais eficiente, seguida pela escovação. Os três protocolos de higiene foram diferentes da água (controle).

Figura 79 - Comparação das médias (DP) de UFC (Log10) de *S. mutans* para materiais e protocolos de higiene. Cores iguais indicam igualdade estatística.

Para *S. mutans*, a maior redução na contagem de UFC ocorreu com o silicone MDX e a clorexidina foi a solução mais eficiente, seguida pela escovação.

Discussão

Neste estudo, por meio do método de hibridação DNA *Checkerboard* foram identificadas as espécies microbianas presentes nas próteses intra-orais e faciais confeccionadas em resina acrílica ou silicone e tecidos adjacentes a elas. Em adição, avaliamos a efetividade de diferentes protocolos de higiene na redução da contagem de UFC de espécies selecionadas a partir da identificação, por meio da formação de biofilmes em corpos de prova confeccionados com o novo silicone proposto (Bio-Skin) e com um silicone padrão-ouro (MDX 4-4210). Trinta e oito espécies de micro-organismos, incluindo bactérias e fungos foram investigados. Os resultados mostraram que todas as espécies foram detectadas nas próteses ou nos tecidos adjacentes. Das 38 espécies analisadas, 19 apareceram em mais de 50% das próteses e 14, em 30 a 49%. Quando analisadas as amostras coletadas nos tecidos adjacentes, 10 micro-organismos foram encontrados em mais de 50% dos participantes e 20 micro-organismos apareceram em 30 e 49%. O método de hibridação de DNA *Checkerboard* utilizado pode detectar micro-organismos viáveis e não viáveis e prover informações substanciais da presença de espécies não cultiváveis ou fastidiosas que possam estar aderidas às superfícies estudadas. É um método mais rápido e mais adequado que os métodos de cultura convencional (Nascimento *et al.*, 2012).

Com relação às características demográficas do estudo, os resultados mostraram que a maioria dos participantes foi do gênero masculino (61,5%), com média etária de 52 anos. O número maior de homens no presente estudo pode ser explicado por um maior acometimento de perdas faciais extensas neste gênero, em virtude a hábitos nocivos como tabagismo e alcoolismo, acidentes de trabalhos, entre outros e, ainda, por muitas vezes os homens são aconselhados por outras pessoas (esposas, mães, filhos) a procurar tratamento (Singh *et al.*, 2012). Em relação ao grau de escolaridade e profissão, houve semelhança entre os participantes, o que nos leva a considerar que as características da amostra não influenciaram nos resultados do estudo. Com relação aos tipos de próteses utilizadas pelos participantes do estudo, os resultados mostraram que a maioria faz uso de próteses faciais (75%), principalmente próteses do tipo ocular (60%), sendo a maioria decorrente de traumas (53%). Uma limitação do nosso estudo foi não conseguirmos uma amostra homogênea tanto quanto ao tipo de prótese, quanto ao tipo de lesão. A maioria das próteses era confeccionada em resina acrílica (95%) e, em relação aos hábitos de higiene, o mais utilizado pelos participantes do estudo foi limpeza com sabão neutro (41%), o que reforça a importância de estudos que avaliem a eficácia de métodos alternativos de higiene, uma vez que ainda não há um consenso na literatura e nem completo esclarecimento por parte dos pacientes.

De acordo com nossos resultados, encontramos uma contagem alta de micro-organismos nas próteses e tecidos. Embora apenas dois participantes tenham relatado não fazer uso de nenhum método de higiene e os outros terem relatado utilizar soro fisiológico (9), sabão neutro (18), escovação com dentífrico (8), somente água (5) ou peróxido de hidrogênio (1), fica claro que há necessidade de instituição de um protocolo eficaz ao qual o paciente siga adequadamente. Neste estudo, avaliamos protocolos de higiene para as próteses, sendo necessários estudos que avaliem métodos de higienização para os tecidos.

Para comparação da eficácia dos protocolos de imersão em clorexidina a 0,12%, *Ricinus communis* a 10% e escovação com sabão neutro, selecionamos espécies importantes na formação e virulência dos biofilmes, representantes de Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras. A eficácia antibacteriana das soluções foi testada contra *S. aureus*, coco Gram-positivo que, associado à redução da função do sistema imune, pode levar a infecções oportunistas (Tada *et al.*, 2006) tais como infecção intestinal, além de serem altamente colonizadores de superfície de próteses obturadoras palatinas (Torres *et al.*, 2000). Além disso, é uma bactéria patogênica que tem sido usada como um indicador da efetividade de protocolos de desinfecção (Kojic *et al.*, 2004). Embora *C. albicans* seja a espécie mais comumente isolada nos biofilmes fúngicos (Mattos *et al.*, 2009), no presente estudo utilizamos a *C. glabrata* por ter sido a mais prevalente das espécies de *Candida* identificadas. A formação do biofilme das espécies de *Candida* acontece em três fases, sendo aderência à superfície, formação da matriz com mutação dimórfica de leveduras para formas de hifas e aumento do material da matriz criando uma arquitetura tridimensional (Chandra *et al.*, 2001). A formação e estruturação do biofilme são influenciadas pela natureza da superfície de contato, fatores ambientais e morfogênese das espécies de *Candida* envolvidas. A natureza química da superfície parece ser um fator de influência na magnitude da formação do biofilme, e a arquitetura do biofilme é diferente quando é formado em superfície de celulose, cateteres (Hawser *et al.*, 1994), sendo quase zero (0) em superfícies de silicone (Hawser *et al.*, 1994).

Muitas espécies de *Candida* têm se mostrado capazes de formar biofilme em diferentes graus. Um estudo *in vitro* mostrou que *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* e *C. glabrata* produziram menos biofilme que *C. albicans* quando avaliado por meio de peso seco, colorimetria e ensaio por radioisótopo (Hawser *et al.*, 1994) assim como por microscopia (Kojic *et al.*, 2004). No entanto, estudos têm mostrado pouca variabilidade na produção do biofilme por *C. albicans* e outras espécies (Hawser *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2003), quando analisados por meio de ensaios bioquímicos (Kojic *et al.*, 2002).

Os resultados da identificação pelo método de hibridação de *DNA Checkerboard* indicaram maior frequência e contagem de *C. glabrata* quando comparada às demais espécies, inclusive *C. albicans*. Estes resultados concordam parcialmente com os de Nayak et al. (2012) que encontraram maior prevalência de *C. glabrata* em mulheres quando comparado com homens usuários de próteses. *C. glabrata* é a segunda causa mais comum de candidemia nos Estados Unidos (Pfaller et al., 2007) e, no Brasil, tem se mostrado como um patógeno preocupante em função do desenvolvimento de resistência à terapia com ázóis (Colombo et al., 2013), além do fato de ser uma espécie frequentemente isolada em pacientes imunocomprometidos (Onyewu et al., 2003), sendo, portanto, preocupante o aumento na prevalência desta espécie em infecções sistêmicas, em virtude à alta taxa de mortalidade.

Ainda, a eficácia dos protocolos de higiene foi testada contra *S. mutans*, coco Gram-positivo que exerce papel fundamental na colonização inicial do biofilme e é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária (Thein et al., 2006); contra o *E. faecalis*, coco Gram-positivo relacionado a várias doenças da cavidade bucal, tais como, periodontites apicais, cáries e infecções endodônticas recorrentes (Paradella et al., 2007) e ainda, pode estar associado a lesões em mucosa oral em indivíduos imunocomprometidos e na colonização de outros sítios do corpo humano, favorecendo a ocorrência de endocardite bacteriana (Smyth et al., 1987).; contra *E. coli*, bactéria bacilar Gram-negativa considerada uma bactéria transitória da cavidade bucal, responsável pela aderência inicial de leveduras sobre várias superfícies (Samaranayake et al., 1988); e contra *P. aeruginosa*, que é frequentemente associada com pneumonia em indivíduos hospitalizados ou institucionalizados, sendo a cavidade oral uma das maiores fontes deste patógeno, principalmente na presença de pobre higiene oral (Souto et al., 2014).

Os resultados deste estudo indicaram que a contagem de UFC foi influenciada pelo material e protocolo de higiene. O silicone MDX 4-4210 apresentou menor número de UFC, o qual apresentou uma superfície mais lisa após a obtenção dos corpos de prova. Segundo Bollen et al. (1997), valores de rugosidade superficial abaixo de 0,2µm dificultam a formação do biofilme e, ambos os materiais apresentaram rugosidade superior à este parâmetro.

Quanto aos protocolos de higiene, a imersão em clorexidina a 0,12% e a escovação com sabão neutro foram os mais eficientes. Estes resultados não são surpreendentes uma vez que a clorexidina tem sido relatada como um efetivo agente antimicrobiano, reduzindo a formação do biofilme, colonização microbiana e infecção da cavidade bucal (de Andrade et al., 2012; Goiato et al., 2012; Haddad et al., 2011).

A clorexidina foi sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele (Davies *et al.*, 1954). Caracteriza-se por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e gluconato, sendo este último, mais comumente empregado em fórmulas comerciais. Possui amplo espectro de ação, agindo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (Davies *et al.*, 1954). O seu mecanismo de ação pode ser explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio (Zanatta *et al.*, 2007).

Quanto à escovação, estudos mostram sua efetividade na remoção do biofilme (Paranhos *et al.*, 2007) e quando associado à soluções de imersão, a efetividade é ainda maior (Goiato *et al.*, 2012). Os dois protocolos, imersão em clorexidina a 0,12% e escovação com sabão neutro reduziram a contagem de UFC em mais de um (01) log em ambos os materiais, o que pode ser considerado um resultado bastante satisfatório.

Ainda, esperava-se encontrar uma ação antimicrobiana eficaz para a solução de *Ricinus communis*, uma vez que Leite *et al.* (2014) indicou uma CIM de 0,0781%, para os mesmos micro-organismos avaliados, assim como outros estudos (Badaró *et al.*, 2013; Pisani *et al.*, 2010; Pisani *et al.*, 2012) relataram a eficácia dessa solução. A metodologia de formação de biofilme garante uma maior proteção aos micro-organismos em função da presença de uma matriz glicosídica e polissacarídeos que podem ter impedido a ação da solução de *Ricinus communis*. Estudos futuros poderiam ser realizados associando a escovação para destruturação do biofilme, com imersão em *Ricinus communis*. Além disso, o mecanismo exato pelo qual o éster do ácido ricinoléico exerce sua atividade antimicrobiana ainda não é claro, e mais estudos são necessários. Uma das limitações do presente estudo foi a utilização do método de cultura convencional para avaliação dos protocolos de higiene, uma vez que, em função do custo, tempo e dificuldade de desenvolvimento de alguns micro-organismos, ela foi limitada a um número reduzido de espécies, embora estas sejam de extrema importância.

Ainda, o estudo da microbiota específica da região maxilofacial é inédito e poucos são os relatos encontrados na literatura, o que torna difícil o estabelecimento de soluções higienizadoras ideais para a especialidade. Estudos futuros poderiam ser realizados, avaliando as soluções higienizadoras *in vivo*, por meio de estudos clínicos controlados.

Em relação às propriedades dos materiais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a alteração de cor, dureza Shore A, rugosidade superficial e absorção de líquidos de um novo silicone para Prótese facial quando submetido a diferentes protocolos de higienização. O silicone proposto tem sido utilizado em reabilitações ortopédicas e, segundo o fabricante, apresenta alta resistência, elasticidade, facilidade de manuseio e biocompatibilidade. Como material de comparação, foi selecionado o silicone MDX 4-4210, muito utilizado por clínicos e pesquisadores em virtude de sua facilidade de manipulação, menor tendência à incorporação de bolhas e estabilidade estrutural (Goiato *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2014). Embora suas propriedades sejam bem estabelecidas, esse silicone apresenta custo elevado (Goiato *et al.*, 2009) e é de difícil aquisição, o que limita o acesso para a maioria dos profissionais da área.

Hábitos regulares de higiene, além de promover saúde aos tecidos adjacentes, são importantes para aumentar a longevidade da prótese, e contribuir para a qualidade de vida de pacientes (Goiato *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2011). Embora a manutenção da higiene seja de extrema importância, a literatura ainda não estabeleceu métodos que apresentem poder de limpeza e desinfecção que, ao mesmo tempo, não degrade os silicones maxilofaciais. As pesquisas realizadas têm avaliado o uso de soluções químicas (Goiato *et al.*, 2012; Eleni *et al.*, 2013;) como método para higiene de polímeros de silicone. Entretanto, os resultados indicam que quando utilizada por períodos prolongados, pode gerar alterações em propriedades importantes dos materiais. Além disso, a literatura relacionada à higiene de próteses (Pisani *et al.*, 2012; Pisani *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2014) salienta a necessidade de associação do método químico com o método mecânico (escovação) para a efetiva eliminação dos micro-organismos. Porém, há pesquisadores que desaconselham a escovação, uma vez que a fricção mecânica promovida pelas cerdas da escova pode remover parte dos pigmentos superficiais, além de causar danos na superfície dos silicones (Goiato *et al.*, 2012). Com o objetivo de esclarecer estas controvérsias em relação às propriedades físicas e mecânicas dos silicones, o presente estudo avaliou os efeitos da escovação associada à imersão em diferentes soluções.

Segundo relatos da literatura, a durabilidade média de uma prótese facial é de aproximadamente um ano (Hatamleh *et al.*, 2011). Sendo assim, os materiais foram submetidos à simulação de um ano de higienização. As soluções selecionadas foram o gluconato de clorexidina a 0,12% e uma solução de *Ricinus communis* a 10% (éster do ácido ricinoléico) com base em estudos que salientam a atividade antimicrobiana (Pisani *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo indicaram que as menores alterações de cor foram encontradas no silicone Bio-Skin pigmentado com pó de maquiagem isoladamente e associado ao opacificador independente do protocolo de higienização. Segundo Kiat-Amnuay *et al.* (2002 e 2008) e Goiato *et al.* (2011), a associação de pigmentos e opacificadores com polímeros de silicone aumenta a longevidade da prótese, uma vez que sua estabilidade de cor é mantida por um período maior. Ainda, considerando as menores alterações de cor para silicone Bio-Skin do grupo GPO, sugere-se que o opacificador e os pigmentos de pó de maquiagem tenham sido incorporados adequadamente e que os mesmos não foram dissolvidos e nem modificados durante os protocolos de higiene.

Segundo Jin *et al.* (2003), os fatores que podem contribuir para a alteração de cor dos materiais são vários. Dentre eles incluem-se acúmulo de manchas, desidratação e oxidação das ligações duplas de carbono que, ao reagirem com algumas soluções de higiene produzem compostos coloridos e degradação contínua dos materiais. A análise dos protocolos de higiene isoladamente mostra que a solução de *Ricinus communis*, causou a maior alteração de cor. Esta solução apresenta o ricinoleato de sódio (Burdock *et al.*, 2006), solúvel em água e responsável pela cor amarelada da solução o que pode ter causado o manchamento superficial dos materiais.

Cabe ressaltar que, embora os dois silicones tenham apresentado alterações de cor ($\Delta E > 0$), essas foram clinicamente aceitáveis em todos os grupos avaliados, uma vez que foram menores que 3,3 (Tabela 10) (Mutlu-Sagesen *et al.* 2005; Polyzois *et al.*, 1999). Estudos mostram resultados variáveis em relação aos diferentes materiais e protocolos de higiene (Eleni *et al.*, 2013) indicando que, para cada material, parece haver um protocolo de higiene mais apropriado que outro, uma vez que podem afetar de diversas maneiras, diferentes propriedades.

Outra propriedade relacionada ao sucesso de reabilitações maxilofaciais é a dureza superficial, pois está intimamente relacionada à textura e flexibilidade do mesmo (Pinheiro *et al.*, 2014). Valores satisfatórios de dureza garantem que as próteses acompanhem os movimentos faciais durante a execução de movimentos funcionais como fala, sorriso, mastigação e outros (Goiato *et al.*, 2009). Os resultados indicaram variações de dureza menores que 3 unidades Shore A (Tabela 12) para todos os grupos testados, podendo-se considerar um resultado satisfatório. Diminuição dos valores de dureza pode levar tanto a desadaptação das margens da prótese como favorecer o enrugamento do silicone (Saboya *et al.*, 1997) e, ao contrário, aumento nos valores pode tornar a prótese muito rígida, fazendo com que a mesma não acompanhe a movimentação muscular, prejudicando a estética

(Rezende, 1997). Portanto, é desejável que o silicone mantenha sua dureza inicial ao longo da vida útil da prótese. Acreditamos que o valor de dureza ideal é aquele que atenda às necessidades clínicas da prótese, ou seja, um valor de dureza que permita uma boa adaptação às margens da lesão sem perder a flexibilidade. Cabe ressaltar que os silicones sofreram modificações nas últimas décadas, com adição de partículas de reforço, o que pode justificar os valores de dureza mais elevados com os silicones deste estudo.

A análise isolada dos fatores indicou que a dureza foi influenciada pela pigmentação e protocolos de higienização (Tabela 11). O grupo controle (sem pigmento) sofreu as maiores alterações da dureza se comparado aos grupos pigmentados o que sugere uma possível interação dos pigmentos com a cadeia polimérica dos materiais, e consequente aumento de densidade, peso molecular e concentração das ligações químicas dos silicones (Aziz *et al.*, 2003), tornando-os mais estáveis. Quanto ao protocolo de higiene, a maior alteração foi promovida pela escovação e imersão em água. Segundo Aziz *et al.* (2003), longos períodos de imersão (simulação de um ano de uso clínico) podem proporcionar absorção de água pelo corpo de prova e alteração dos valores de dureza. Esta afirmação corrobora com nossos resultados, onde o GC apresentou porcentagem de absorção maior no grupo EA se comparado com os demais (Figura 53). Quando da interação entre os fatores (Tabela 12), o silicone MDX 4-4210 apresentou menor variação da dureza quando exposto ao protocolo EC10,12%, e concordam com Goiato *et al.* (2009) e Mancuso *et al.* (2009). Neste caso, porém, não houve relação com absorção do MDX 4-4210 exposto à escovação e imersão em clorexidina, uma vez que as maiores porcentagens de absorção foram encontradas neste grupo.

É provável que o opacificador sulfato de Bário não tenha alterado a matriz dos silicones, nem causado interferência no grau de reticulação de suas cadeias poliméricas, uma vez que o comportamento exibido pelas amostras contendo bário foi semelhante para as amostras que não sofreram a adição do opacificador. Além disso, sabe-se que as partículas de bário são capazes de se associar fortemente com cadeias de silicone (Goiato *et al.*, 2010), mesmo depois de diferentes processos de higienização. Se as partículas de sulfato de bário tivessem sido removidas durante a higienização, mesmo que parcialmente, um aumento da porosidade acompanhado de redução na dureza superficial seria esperado (Goiato *et al.*, 2009).

Ainda, dentre as propriedades, a rugosidade superficial dos materiais também foi avaliada por estar intimamente relacionada ao acúmulo de biofilme sobre a superfície da prótese. A unidade de medida de rugosidade é a Ra, que representa a variação aritmética média entre as irregularidades do trajeto de mensuração (Radford *et al.*, 1999). A literatura

não define um valor específico de rugosidade para silicones maxilofaciais, porém, sabe-se, de maneira geral, que valores inferiores a 0,2 μm dificultam a adesão de micro-organismos às superfícies abióticas (Bollen *et al.*, 1997). Ambos os silicones apresentaram valores médios superiores ao aceitável, variando entre 0,40 e 0,67 para o MDX 4-4210 e entre 0,8 a 1,5 μm para o Bio-Skin, sugerindo que a superfície dos dois silicones pode favorecer a formação de biofilme. Estes resultados podem explicar a menor contagem de UFC encontrada para o silicone MDX 4-4210.

Quando analisados os valores da variação ao longo do período experimental a rugosidade não foi influenciada pela pigmentação ou protocolo de higiene ($p=0,224$) e estes resultados concordam com Goiato *et al.* (2009). No entanto, o silicone MDX 4-4210 apresentou a menor variação de rugosidade (Tabela 14), sugerindo maior estabilidade em relação à esta propriedade. Uma limitação do presente estudo pode ter sido a forma de obtenção dos corpos de prova. Por ser um material mais denso que o MDX 4-4210, o Bio-Skin foi compactado com um cilindro no interior das matrizes enquanto o primeiro, por apresentar característica fluída, foi vertido sem esforço. Com base na experiência adquirida na confecção dos corpos de prova, pode-se sugerir que a forma de obtenção dos mesmos influenciou este resultado. A utilização de superfícies lisas e prensagem em mufla pneumática poderiam gerar resultados diferentes. As imagens de MEV mostram claramente a diferença superficial dos silicones avaliados. Chama a atenção, porém, que ambos os silicones apresentaram uma redução da rugosidade quando expostos aos três protocolos de higiene, provavelmente em função do pH. Segundo Pisani *et al.* (2010), o pH alcalino poderia ser responsável pelo polimento químico da superfície do material, no entanto, no presente estudo esta característica não foi avaliada, sendo necessária a sua observação.

Por fim, embora estudos correlacionem resultados de alteração de cor, dureza e rugosidade com a absorção de líquidos, nenhum deles avaliou esta propriedade com silicones para prótese facial. Sendo assim, os resultados do presente estudo são importantes. Foram observados comportamentos diferentes dos materiais em relação à pigmentação e higiene. Para o silicone MDX 4-4210, a maior porcentagem de absorção ocorreu em função da escovação e imersão em clorexidina para todos os grupos de pigmentos. Para o silicone Bio-Skin, foram detectadas diferenças nos grupos GC e GO após escovação com sabão neutro e imersão em água e somente este protocolo causou diferença na absorção entre os materiais, onde o Bio-Skin apresentou maiores porcentagens de absorção nos grupos GC, GO e GOP, quando comparado ao MDX 4-4210. Para os demais protocolos, não houve diferença de absorção entre os materiais. Estes resultados não eram esperados, uma vez que a literatura

indica que a presença de íons, geralmente encontrados nas soluções de higiene, promove maior absorção se comparada à água. Sendo assim, outros estudos precisam ser realizados com relação às soluções de imersão.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que:

1. As próteses e tecidos adjacentes são altamente colonizados por bactérias e fungos havendo a necessidade de cuidados diários com a higiene de ambos.
2. A contagem de UFC foi menor para o silicone MDX 4-4210 se comparado ao Bio-Skin quando imersos em solução de gluconato de clorexidina a 0,12%. Esta solução foi a mais eficiente na redução de UFC de todos os micro-organismos avaliados para ambos os materiais, seguida pela escovação.
3. Com relação às propriedades mecânicas, as maiores alterações ocorreram nos grupo sem pigmentação, sugerindo que a adição de pigmento de pó de maquiagem isoladamente ou em associação ao opacificador é bem indicada. Os dois silicones avaliados apresentaram variações clinicamente aceitáveis, independente do protocolo de higiene ou pigmentação, exceto no que se relaciona à rugosidade superficial, em que ambos apresentaram valores acima dos recomendados.
4. Os resultados do presente estudo sugerem que os dois silicones poderiam ser utilizados clinicamente associados à imersão em gluconato de clorexidina a 0,12% e escovação com escova macia e sabão neutro.

*Referências**

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors, adaptado pela U.S. National Library of Medicine. Também conhecido como estilo Vancouver.

Abere DJ. Post-placement care of complete and removable partial dentures. *Dent Clin North Am.* 1979;23(1):143-51.

Allen PF, Watson G, Stassen L, Mcmillan AS. Peri-implant soft tissue maintenance in patients with cranio facial implant retained prostheses. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 29(2):99-103.

American Dental Association. Specification n. 12 for denture base polymers. Councils on Dental Materials and Devices, Reports of Councils and Bureaus. *J. Am. Dental Assoc* 1983; 90:39-49.

Andrade IM, Andrade KM, Pisani MX, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Paranhos HdeF. Trial of an experimental castor oil solution for cleaning dentures. *Braz Dent J.* 2014;25(1):43-7.

Andres CJ, Haug SP, Munoz CA, Bernal G. Effects of enviromental factors on maxilofacial elastomers: Part I – literature review. *J Prosthet Dent.* 1992 Aug;68:327-330.

Ariani N, Vissink A, van Oort RP, Kusdhany L, Djais A, Rahardjo TB, van derMei HC, Krom BP. Microbial biofilmson facial prostheses. *Biofouling.* 2012;28(6):583-91.

Azambuja TWF, Padilha DMP, Bercini F, Burzlaff JB, Puricelli E. Face: possibilidade de reconstrução protética. *Fac Odontol Porto Alegre.* 1994;35:18-19.

Aziz T, Waters M, Jagger R. Development of a new poly(dimethysiloxane) maxillofacial prosthetic material. *J Biomed Mater Res Appl Biomater.* 2003;65(2):252-61.

Badaró, Mauricio Malheiros. Avaliação clínica e laboratorial de uma solução experimental à base de Ricinus communis em comparação ao hipoclorito de sódio para higiene de próteses totais. 2013. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Barbosa RES, Do Nascimento C, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, De Albulquerque RF Jr. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *J Prosthodont.* 2009;18(5):376-381.

Barnhart GW. A new material and technic in the art of somato- prosthesis. *J Dent Res.* 1960;39:836-844.

Benoist M. Utilisation des resins souples em prothese maxilla-faciale. *Rev Stomatol.* 1962;63:532-33.

Bell WT, Chalian VA, Moore BK. Polydimethyl siloxane materials in maxillofacial prosthetics: Evaluation and comparison of physical properties. *J Prosthet Dent.* 1985;54:404-410.

Bollen CML, Lambrechts P, Quiryen M. Comparison of surface roughness of oral hardness materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997;13(4):258-69.

Bowden G, Edwardsson S. Ecologia oral e a cárie dentária. In: *Cariologia Clínica*. Editora Santos, 1995, p.45-62.

Burdock GA, Carabin IG, Griffiths JC. Toxicology and pharmacology of sodium ricinoleate. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:1689-98.

Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*. 2009;42(3):227-37.

Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *J Prosthet Dent*. 2005;93(5):483-7.

Carl JA, Haug SP, Brown DT, Bernal G. Effects of environment factors on maxillofacial elastomers: Part II – Report of survey. *J Prosthet Dent*. 1992;68:519-22.

Chandra J, Kunh DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol*. 2001;183:5385-94.

Chung RW, Siu AS, Chu FC, Chow TW. Magnet-retained auricular prosthesis with an implant-supported composite: a clinical report. *J Prosthet Dent*. 2003;89(5):446-9.

Cole EC, Robinson R. Test methodology for evaluation of germicides. In: Ascenzi JM. *Handbook of disinfectants and antiseptics*. New York: Marcel Dekker Inc. 1996; 1-13.

Colombo AL, Guimarães T, Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles Fd, Salles MJ, Cunha CA, Yasuda MA, Moretti ML, Nucci M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(3):283-312.

Costa HM, Ramos VD, Abrantes TAS, Castro DF, Visconte LLY, Nunes RCR, Furtado CRG. Effects from the castor oilon sílica-filled rubber compounds. *Polimeros*. 2004;14(1):46-50.

Craig RG, Koran A, Yu R, Spencer J. Color stability of elastomers for maxillofacial appliances. *J Dent Res*, v. 57, p. 866-871, 1978.

Dahlen G, Leonhardt AA. A new Checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21(1):6-11.

Da Silva PMB, Acosta EJTR, Pinto LR, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, Porto VC. Microscopial analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*. 2011;54(6):e712-7.

Davies DG. Subphrenic abscess due to *Salmonella dublin* infection. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv*. 1954 Oct;13:202-3.

de Andrade IM, Cruz PC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Souza-Gugelmin MC, Paranhos HF. Effect of chlorhexidine on denture biofilm accumulation. *J Prosthodont*. 2012;21(1):2-6.

Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleansers. *J Prosthet Dent*. 1988;60(4):467-70.

do Nascimento C, dos Santos JN, Pedrazzi V, Pita MS, Monesi N, Ribeiro RF, de Albuquerque RF Jr. Impact of temperature and time storage on the microbial detection of oral samples by Checkerboard DNA-DNA hybridization method. *Arch Oral Biol*. 2014;59(1):12-21.

do Nascimento C, Muller K, Sato S, Albuquerque RF Jr. Effect of sample storage time on detection of hybridization signals in Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Can J Microbiol*. 2012;58(4):502-6.

do Nascimento C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque RF Jr, Ribeiro RF. In vivo evaluation of *Candida* spp. adhesion on titanium or zirconia abutment surfaces. *Arch Oral Biol*. 2013;58(7):853-61.

do Nascimento C, Sorgini MB, Pita MS, Fernandes FH, Calefi PL, Watanabe E, Pedrazzi V. Effectiveness of three antimicrobial mouthrinses on the disinfection of toothbrushes stored in closed containers: a randomized clinical investigation by DNA Checkerboard and Culture. *Gerodontology*. 2014;31(3):227-36.

Do Nascimento, Cássio. Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante – conector protético sob aplicação de carga – avaliação *in vitro* pelo método de *DNA Checkerboard*. 2010. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Eleni PN, Krokida MK, Frangou MJ, Polyzois GL, Maroulis ZB, Marinos-Kouris D. Structural damages of maxillofacial biopolymers under solar aging. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(9):1675-81..

Eleni PN, Krokida MK, Polyzois GL, Gettleman L. Dynamic mechanical thermal analysis of maxillofacial prosthetic elastomers: the effect of different disinfecting aging procedures. *J Craniofac Surg*. 2014;25(3):e251-5.

Eleni PN, Krokida MK, Polyzois GL, Gettleman L. Effect of different disinfecting procedures on the hardness and color stability of two maxillofacial elastomers over time. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(3):278-83.

Eleni PN, Perivoliotis D, Dragatogiannis DA, Krokida MK, Polyzois GL, Charitidis CA, Ziomas I, Gettleman L. Tensile and microindentation properties of maxillofacial elastomers after different disinfecting procedures. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;28:147-55.

Eleni, PN; Krokida, M; Polyzois, G; Gettleman, L; Bisharat, GI. Effects of outdoor weathering on facial prosthetic elastomers. *Odontology.* 2011;99(1):68-76.

Felipucci DN, Davi LR, Paranhos HF, Bezzon OL, Silva RF, Pagnano VO. Effect of different cleansers on the surface of removable partial denture. *Braz Dent J.* 2011;22(5):392-7.

Ferreira CM, Rosa OPS, Torres AS, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002;13(2): 118-122.

Frogley MD, Ravich D, Wagner HD. Mechanical properties of carbon nanoparticles in forced elastomers. *Comp Sci Technol.* 2003;63:1647-54.

Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF. A review of sunscreen safety and efficacy. *PhotochemPhotobiol.* 1998;68(3):243-56.

Goiato MC, dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Dekon SF. Effect of thermal cycling and disinfection on microhardness of acrylic resin denture base. *J Med Eng Technol.* 2013;37(3):203-7.

Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Iyda MG, Rezende MC, Haddad MF. Effect of disinfection and storage on the flexural strength of ocular prosthetic acrylic resins. *Gerodontology.* 2012;29(2):e838-44.

Goiato MC, Haddad MF, Pesqueira AA, Moreno A, dos Santos DM, Bannwart LC. Effect of chemical disinfection and accelerated aging on color stability of maxillofacial silicone with opacifiers. *J Prosthodont.* 2011;20(7):566-9.

Goiato MC, Haddad MF, Sinhoreti MA, dos Santos DM, Pesqueira AA, Moreno A. Influence of opacifiers on dimensional stability and detail reproduction of maxillofacial silicone elastomer. *Biomed Eng Online.* 2010;16;9:85.

Goiato MC, Pesqueira AA, dos Santos DM, Antenucci RM, Ribeiro PdoP. Evaluation of dimensional change and detail reproduction in silicones for facial prostheses. *Acta Odontol Latinoam.* 2008;21(1):85-8.

Goiato MC, Pesqueira AA, dos Santos DM, Dekon SFC. Evaluation of hardness and surface roughness of two maxillofacial silicones following disinfection. *Braz Oral Res.* 2009;23(1):49-53.

Goiato MC, Ribeiro PP, Santos DM, Fernandes AUR, Santos PH, Pellizzer EP. Avaliação da recuperação elástica e da resistência ao rasgamento de um silicone para uso em prótese facial sob a influência da pigmentação e da desinfecção química. *Rev Odontol UNESP*, v. 33, p. 189-194, 2004.

Guiotti, AM, Goiato MC, Dos Santos DM. Evaluation of the Shore A hardness a silicone for facial prosthesis as to the effect of storage period and chemical disinfection. *J Craniofac Surg.* 2010;21(2):323-7.

Guiotti AM, Goiato MC. Avaliação de um silicone nacional para próteses faciais em função do efeito do tempo de armazenagem, da desinfecção química e da pigmentação sobre a deterioração marginal e a dureza SHORE A. *Cienc Odontol Bras.* 2008; 11:64-74.

Guiotti AM, Goiato MC. Silicones para próteses faciais: efeito da pigmentação e envelhecimento sobre dimensão e superfície. *Cienc Odontol Bras.* 2003;6(3):86-97.

Gunay Y, Kurtoglu C, Atay A, Karayazgan B, Gurbuz C. Effect of tulle on the mechanical properties of a maxillofacial silicone elastomer. *Dent Materials J.* 2008;27(6):775 – 779.

Haddad MF, Goiato MC, Dos Santos DM, Pesqueira AA, Moreno A, Pellizzer EP. Influence of pigment and opacifier on dimensional stability and detail reproduction of maxillofacial silicone elastomer. *J Craniofac Surg.* 2011;22(5):1612-6.

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 1998;25:346–353.

Han Y, Zhao Y, Xie C, Powers JM, Kiat-amnuay S. Color stability of pigmented maxillofacial silicone elastomer: effects of nano-oxides as opacifiers. *J Dent.* 2010;38Suppl 2:e100-5.

Hatamleh MM, Polyzois GL, Silikas N, Watts DC. Effect of Extraoral Aging Conditions on Mechanical Properties of Maxillofacial Silicone Elastomer. *J Prosthodont.* 2011;20:439-446.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* 1994;62:915-921.

Jin C, Nikawa H, Makihiro S, Hamada T, Furukawa M, Murata H. Changes in surface roughness and colour stability of soft denture lining materials caused by denture cleansers. *J Oral Rehabil.* 2003 Feb;30(2):125-30.

Kazanji MN, Watkinson AC. Influence of thickness, boxing, and storage on the softness of resilient denture lining materials. *J Prosthet Dent*. 1988;59(6):677-80.

Karayazgan B, Gunay Y, Evlioglu G Improved edge strength in a facial prosthesis by incorporation of tulle: a clinical report. *J Prosthet Dent*. 2003;90:526-529.

Karacaer O, Polat TN, Tezvergil A, Lassila LV, Vallittu PK. The effect of length and concentration of glass fibers on the mechanical properties of an injection- and a compression-molded denture base polymer. *J Prosthet Dent*. 2003;90:385-393.

Kiat-amnuay S, Jacob RF, Chambers MS, Anderson JD, Sheppard RA, Johnston DA, Haugh GS, Gettleman L. Clinical trial of chlorinated polyethylene for facial prosthetics. *Int J Prosthodont*. 2010;23(3):263-70.

Kiat-amnuay S, Johnston DA, Powers JM, Jacob RF. Color stability of dry earth pigmented maxillofacial silicone A-2186 subjected to microwave energy exposure. *J Prosthodont*. 2005;14(2):91-6.

Kiat-Amnuay S, Lemon JC, Powers JM. Effect of opacifiers on color stability of pigmented maxillofacial silicone A-2186 subjected to artificial aging. *J Prosthodont*. 2002;11(2):109-16.

Kiat-Amnuay S, Mekayarajjananonth T, Powers JM, Chambers MS, Lemon JC. Interactions of pigments and opacifiers on color stability of MDX4-4210/type A maxillofacial elastomers subjected to artificial aging. *J Prosthet Dent*. 2006;95(3):249-57.

Kiat-Amnuay S, Lemon JC, Powers JM. Effect of opacifiers on color stability of pigmented maxillofacial silicone A-2186 subjected to artificial aging. *J Prosthodont*. 2002 Jun;11(2):109-16.

Kojic EM, Darouiche RO, Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2004;70:878-888.

Lai JH, Hodges JS. Effects of processing parameters on physical properties of the silicone maxillofacial prosthetic materials. *J Prosthet Dent*. 1999;15:450-455.

Lai JH, Wang LL, Ko CC, De Long RL, Hodges JS. New organosilicon maxillofacial prosthetic materials. *Dent Mater*. 2002;18:281-286.

Leite VM, Pinheiro JB, Pisani MX, Watanabe E, de Souza RF, Paranhos HdeF, Lovato-Silva CH. In vitro antimicrobial activity of an experimental dentifrice based on *Ricinus communis*. *Braz Dent J*. 2014;25(3):191-6.

Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Microbiology. 2003;149:353-62.

Maida A, Pinheiro JB, Daher C, Paranhos HdeF., Macedo, A., Lovato-Silva C. Avaliação da dureza de um silicone médico com potencial aplicação em prótese facial. Revista Odontológica do Brasil Central. 2011;20:1-6.

Mancuso DN, Goiato MC, Dekon SF, Gennari-Filho H. Visual evaluation of color stability after accelerated aging of pigmented and nonpigmented silicones to be used in facial prostheses. Indian J Dent Res. 2009;20(1):77-80.

Mancuso DN, Zuim PRJ, Rocha EP, Assunção WG, Goiato MC. Alteração da cor das próteses maxilofaciais: revisão de literatura. Revista de Odontologia da UNESP. 2005; 34(4): 173-78.

Marra J, Paleari AG, Rodrigues LS, Leite ARP, Pero AC, Compagnoni MA. Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. J Appl Oral Sci. 2012;20(6):643-8.

Mattos BS, Sousa AA, Magalhães MH, André M, Brito E Dias R. *Candida albicans* in patients with oronasal communication and obturator prostheses. Braz Dent J. 2009;20(4):336-40.

Meneghin MP, Nomelini SM, Sousa-Neto MD, Marchesan MA, França SC, dos Santos HS. Morphologic and morphometric analysis of the root canal apical third cleaning after biomechanical preparation using 3.3% *Ricinus communis* detergent and 1% NaOCl as irrigating solutions. J Appl Oral Sci. 2006 Jun;14(3):178-82.

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

Morris-Jones R, Robertson SJ, Ross JS, White IR, McFadden JP, Rycroft RJ. Dermatitis caused by physical irritants. Br J Dermatol. 2002;147(2):270-5.

Montgomery PC, Kiat-Amnuay S. Survey of currently used materials for fabrication of extraoral maxillofacial prostheses in North America, Europe, Asia, and Australia. J Prosthodont 2010;19:482-90.

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. J Endod. 2014 Jul;40(7):899-906.

Mutlu-Sagesen L, Ergun G, Ozkan Y, Semiz M. Color stability of a dental composite after immersion in various media. Dent Mater J. 2005;24(3):382-90.

Nayak S, Kavitha B, Sriram G, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B, Dorothy AL. Comparative study of Candida by conventional and CHROMagar method in non-denture and denture wearers by oral rinse technique. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(4):490-7.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999;12(2): 153-9.

Nguyen CT, Chambers MS, Powers JM, Kiat-Amnuay S. Effect of opacifiers and UV absorbers on pigmented maxillofacial silicone elastomer, part 2: mechanical properties after artificial aging. *J Prosthet Dent.* 2013;109(6):402-10.

Oakley BB, Fielder TL, Marrazo JM, Fredricks DN. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(15):4898-909.

Oliveira D, Di Luccio M, Faccio C, Dalla Rosa C, Bender JP, Lipke N, Amroginski C, Dariva C, de Oliveira JV. Optimization of alkaline transesterification of soybean oil and castor oil for biodiesel production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005;121-124:553-60.

Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):956-64.

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis* considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2007;36(2):163-8.

Paranhos HdeF, Silva-Lovato CH, Venezian GC, Macedo LD, de Souza RF. Distribution of biofilm on internal and external surfaces of upper complete dentures: the effect of hygiene instruction. *Gerodontology.* 2007;24(3):162-8

Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont.* 2009 Jul;18(5):427-31.

Pesqueira AA, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Moreno A. Effect of disinfection and accelerated ageing on dimensional stability and detail reproduction of a facial silicone with nanoparticles. *J Med Eng Technol.* 2012;36(4):217-21.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-63.

Pinelli LA, Montandon AA, Corbi SC, Moraes TA, Fais LM. *Ricinus communis* treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. *J Oral Rehabil.* 2013;40(5):375-80.

Pinheiro JB, Daher C, Maida AFP, Leite VMF, Paranhos HdeF, Silva-Lovato CHL. Effects of pigmentation and accelerated aging on color stability of a medical silicone with potential for use in maxillofacial prosthetics. *Rev Odontol UNESP*. 2011;40(3):1-6.

Pinheiro JB, Reis AC, Pisani MX, Leite VM, Souza RF, Paranhos HdeF, Silva-Lovato CHL.. Microstructural characterization and evaluation of the properties of polymeric materials for maxillofacial prosthetics. *J Med Eng Technol*. 2014;38(2):67-75.

Pinheiro, Juliana Barchelli. Correlação estrutura-propriedades de silicones para prótese facial – Efeitos da pigmentação e do envelhecimento. 2012. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HdeF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont*. 2010;19(5):369-73.

Pisani MX, Silva-Lovato CH, Paranhos HdeF, Souza RF, Macedo AP. Evaluation of experimental cleanser solution of *Ricinus communis*: effect on soft denture liner properties. *Gerodontology*. 2012;29(2):e179-85.

Pisani MX, Macedo AP, Paranhos HdeF, Silva-Lovato CH. Effect of experimental *Ricinus communis* solution for denture cleaning on the properties of acrylic resin teeth. *Braz Dent J*. 2012;23(1):15-21.

Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the Millennium. *J Clin Pathol*. 2000;53(1):71-75.

Polyzois, GL. Color stability of facial silicone prosthetic polymers after outdoor weathening. *J Prosthet Dent*. 1999;82:447-450.

Polyzois GL, Hensten-Pettersen A, Kullman A. Effects of RTC-silicone maxillofacial prosthetic elastomers on cell cultures. *J Prosthet Dent*. 1994;71(5):505-10.

Polyzois GL, Kakaboura AI, Eliades GC. Curing efficiency of visible light- and dual-cured denture reliners. *Int J Prosthodont*. 2000;13(6):520-5.

Polyzois GL, Lyons K. Monitoring Shore A hardness of silicone facial elastomers: the effect of natural aging and silicone type after 1 year. *J Craniofac Surg*. 2014;25(4):1217-21.

Polyzois GL, Pettersen AH. Physicomechanical and cytotoxic properties of room temperature vulcanizing silicone prosthetic elastomers. *Acta Odontol Scand*. 1998;56(4):245-8.

Polyzois, GL; Tarantili, PA; Frangou, MJ. Fracture force, deflection at fracture, and toughness of repaired denture resin subjected to microwave polymerization or reinforced with wire or glass fiber. *J ProsthetDent*. 2001;86:613-619.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):99-116.

Rezende J.R.V. Fundamentos da prótese buco-maxilo-facial. São Paulo: Sarvier; 1997.

Rosa PC, Mancini MN, Camargo SE, Garrido AD, Camargo CH, Rode SdeM. Dimensional alterations and solubility of new endodontic sealers. *Braz Dent J*. 2010;21(4):301-4.

Saboya ACL, Carvalho JCM, André M, Mattos BSC, Rossa R. Avaliação da dureza “Shore A” e da resistência ao rasgamento de alguns silicones acéticos modificados para uso em prótese facial. *Rev Odontol USP*. 1997;11(2):93-97.

Samaranayake LP, Mc Laughlin T, Mac Farlane T. Adherence of *Candida* species to fibrin clots in vitro. *Mycopathologia*, 1988;102(2):135-8.

Santos DM, Goiato MC, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF. Influence of pigments and opacifiers on color stability of a facial silicone submitted to accelerated aging. *J Prosthodont*. 2011;20(3):205-8.

Schoen PJ, Raghoobar GM, Van Oort RP, Reintsema H, Van Der Laan BFAM, Burlage FR, et al. Treatment outcome of bone-anchored craniofacial prostheses after tumor surgery. *Cancer*. 2001;92(12):3045-50.

Segundo A de L, Pisani MX, Nascimento C, Souza RF, Paranhos Hde F, Silva-Lovato CH. Clinical trial of an experimental cleaning solution: antibiofilm effect and integrity of a silicone-based denture liner. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(5):534-42.

Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(3):288-93.

Smyth EG, Pomeroy L. Detecting pneumococcal antigen in community acquired pneumonia. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 Nov 28;295(6610):1415.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent JR. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol*. 1971 Aug;42(8):485-96.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994;17(4):788-792.

Souto R, Silva-Boghossian CM, Colombo AP. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz J Microbiol*. 2014;45(2):495-501.

Tada A, Senpuku H, Motozawa Y, Yoshihara A, Hanada N, Tanzawa H. 2006. Association between commensal bacteria and opportunistic pathogens in the dental plaque of elderly individuals. *Clin Microbial Infect*. 2006;12(8):776-81.

Takeuchi CYG, Orbegoso Flores VH, Palma Dibb RG, Panzeri H, Lara EHG, Dinelli W. Assessing the surface roughness of a posterior resin composite: effect of surface sealing. *Oper Dent*. 2003;28(3):281-286.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effects of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilm. *Arch Oral Biol*. 2006;51(8):672-80.

Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Rev Fac Odontol*. 2000;3(2):43-52.

Yu R, Koran A, Craig RG. Physical Properties of Maxillofacial Elastomers Under Conditions of Accelerated Aging. *J Dent Res*. 1980;59:1041-1047.

Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2007 Nov;78(11):2127-34.

Apêndices

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Convidamos você....., RG....., a participar da pesquisa "Identificação da microbiota de próteses faciais e avaliação laboratorial da efetividade de diferentes soluções de higiene", desenvolvido sob a responsabilidade da Cirurgiã-Dentista Juliana Barchelli Pinheiro (Pós graduanda) e com a participação da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos e Pós graduandas Marina Peris Vomero e Vanessa Maria Fagundes Leite. Após receber todas as explicações necessárias para a participação na pesquisa, cabe a você de livre e espontânea vontade se quer assinar esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com a finalidade de autorizar a sua participação na referida pesquisa.

Sendo assim, esclarecemos que:

1. Essa pesquisa é importante para identificar as bactérias e os fungos presentes em sua prótese facial.
2. O estudo tem por objetivo identificar os microrganismos (micróbios) presentes na prótese utilizada por você.
3. Para essa identificação, uma escova macia (cotonete) será passada suavemente na sua prótese e na região do seu rosto que fica em contato com a prótese, para colher os microrganismos (micróbios).
4. Quando os pesquisadores estiverem manipulando suas próteses, estas poderão cair no chão, vindo a quebrar-se. Porém, todos os cuidados serão tomados por nós para que isso não ocorra, e caso aconteça, serão feitas novas próteses faciais imediatamente.
5. Não há previsão de que a pesquisa seja desconfortável ou tenha algum risco para você. Caso ocorra algum dano à sua saúde, em razão da participação na pesquisa, os pesquisadores serão responsáveis por quaisquer despesas e indenizações.
6. Os participantes poderão esclarecer qualquer dúvida sobre a pesquisa antes, durante e após a realização da mesma.
7. Para que a pesquisa possa atingir seus objetivos, os participantes deverão comparecer a clínica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nos dias e horários agendados. Será uma visita única, de preferência no dia em que você estiver recebendo algum tratamento na Faculdade. Caso você venha em outro horário, os pesquisadores se comprometem a ressarcir despesas decorrentes da sua participação no estudo, como transporte e alimentação.
8. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência integral no decorrer da pesquisa, caso algum dano venha a ocorrer com suas próteses.
9. Como benefício, você receberá toda orientação e treinamento para que mantenha suas próteses limpas.
10. A pesquisa não apresenta riscos previsíveis aos participantes, já que se trata de um tratamento baseado apenas na coleta de fungos e bactérias da sua prótese. Você não receberá anestésias, injeções, nem cortes ou pontos (sem cirurgia). Essa pesquisa conta apenas com a observação de suas próteses.
11. Os participantes não terão qualquer custo durante a pesquisa.
12. Os resultados da pesquisa deverão ser publicados em congressos, jornais ou revistas.
13. Os pesquisadores manterão sigilo sobre a sua participação na pesquisa.
14. Como sua participação é voluntária, você tem o direito de interrompê-la em qualquer momento, sem sofrer penalizações. Caso ocorra algum impedimento sério, que o impossibilite de continuar a participar da pesquisa, sua desistência não prejudicará seu atendimento clínico.
15. Qualquer dúvida que você tiver poderá ser esclarecida por um dos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa. Caso necessitar, poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva pelo telefone (16) 3602-4006, ou com qualquer um

dos demais pesquisadores pelo telefone (16) 3602-4800. Você também poderá entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FORP-USP, Ana Aparecida Ferreira do Nascimento, pelo telefone (16) 3602-0251, caso sinta necessidade.

16. Esse termo é emitido em duas vias de igual teor, sendo a última página assinada por todos os pesquisadores e por você e as demais rubricadas. Você receberá uma das vias.

Após esses esclarecimentos, se você, nominado acima, concordar em participar desta pesquisa, solicito que assine abaixo.

Ribeirão Preto, de de 201....

Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

CPF: 186456998-00

Telefone: (16) 3602-4006

Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos

CPF: 258532791-49

Telefone: (16) 3602-4031

Pós graduanda Juliana Barchelli Pinheiro

CPF: 318737738-62

Telefone: (16) 3602-4800

Pós graduanda Marina Peris Vomero

CPF: 370552858-01

Telefone: (16) 3602-4800

Pós graduanda Vanessa Maria Fagundes Leite

CPF: 052682036-57

Telefone: (16) 3602-4800

Paciente ou Responsável

Secretária do CEP: Ana Aparecida Ferreira do Nascimento

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto FORP/USP

Telefone: (16) 3602-0251

Avenida do Café s/n

Bairro: Monte Alegre

Ribeirão Preto - SP

Apêndice B – Questionário sócio-demográfico, contendo as características quanto ao tipo de prótese, tempo de uso, material de confecção, tipo e causa da lesão facial, hábitos de higiene e medicação atual, respondido no momento da coleta e aceite do TCLE, para cada paciente voluntário da pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
Identificação da microbiota de Próteses Faciais e avaliação laboratorial da efetividade de diferentes soluções de higiene

Nome:
Data de Nascimento: Idade: Sexo: Cor:
Endereço:
Cidade:
Escolaridade: Profissão:
RG: CPF:
Data da Coleta:.....Local da Coleta:.....
Prontuário:.....

Tipo de Prótese:

- ☐ Nasal
- ☐ Ocular
- ☐ Óculo-Palpebral
- ☐ Auricular
- ☐ Facial extensa
- ☐ Intra-Oral

Causa da lesão facial:

- ☐ Trauma
- ☐ Onco-cirurgia
- ☐ Congênito

Tempo de uso da Prótese Maxilofacial:

Material de confecção da Prótese Maxilofacial:☐ Silicone☐ Resina AcrílicaFaz higienização da prótese:☐ Não☐ Sim

Como: Com qual frequência:

Faz higiene do local da lesão:

☐ Não☐ Sim

Como: Com qual frequência:

Faz uso de algum medicamento tópico:

☐ Não☐ Sim

Como: Com qual frequência:

Está fazendo uso de algum antibiótico atualmente:

☐ Não☐ Sim

Por que:

Pesquisadora: Juliana Barchelli Pinheiro

Paciente

Apêndice C – Curva de Crescimento para os micro-organismos utilizados no presente estudo.

<i>S. aureus</i>	Absorbância	Número de células
	0,022	192000
	0,042	1200000
	0,080	164000000
	0,096	4,48 x 10 ⁸
<i>E. coli</i>	Absorbância	Número de células
	0,044	3 x 10 ⁷
	0,067	4 x 10 ⁷
	0,081	5,24 x 10 ⁷
	0,107	7,64 x 10 ⁷
	0,112	9,6 x 10 ⁷
	0,114	1,36 x 10 ⁸
	0,119	148 x 10 ⁸
	0,120	128 x 10 ⁸
	0,129	1,24 x 10 ⁸
<i>E. faecalis</i>	Absorbância	Número de células
	0,058	13600000
	0,067	15600000
	0,086	17600000
	0,109	21200000
	0,138	72000000
	0,143	108800000
	0,151	96000000
	0,156	184000000
<i>P. aeruginosa</i>	Absorbância	Número de células
	0,055	21600000
	0,073	29200000
	0,095	40000000
	0,108	46000000
	0,120	148000000
	0,123	356000000
	0,140	440000000
<i>S. mutans</i>	Absorbância	Número de células
	0,080	2,23 x 10 ⁷

Apêndice D - Valores de alteração de cor (ΔE) codos silicones MDX4-4210 e Bio-Skin dos grupos de pigmentação (GC: controle; GP: pó de maquiagem, GO: opacificador e GPO: pó de maquiagem associado ao opacificador), após protocolo de higienização (EA, ERc10% e Ecl0,12%).

	EA				ERc10%				ECl 0,12%			
	GC	GP	GO	GPO	GC	GP	GO	GPO	GC	GP	GO	GPO
MDX4-4210	0,68	1,43	1,43	1,39	2,14	1,15	3,01	1,56	1,03	2,54	1,22	1,16
	0,62	0,82	1,18	1,51	1,68	2,23	2,12	0,94	1,13	2,38	1,23	1,54
	0,72	0,21	0,84	2,23	2,18	1,76	2,5	3,07	1,33	0,47	1,12	2,16
	1,64	2,97	1,69	2,22	2,03	1,01	1,19	3,71	1,48	0,2	2,56	3,42
	1,03	2,1	1,86	3,04	3,48	2,16	0,75	0,86	2,63	1,04	1,3	2,61
	0,81	3,01	0,61	4,04	2,1	2,1	2,7	3,2	0,78	2,97	2,15	3,92
	1,09	0,98	1,25	2,14	2,09	4,01	1,8	1,49	1,65	3,83	0,95	2,03
	1,07	2,18	0,75	1,26	1,65	1,9	3,86	2,09	1,84	0,33	0,94	2,35
	0,92	2,86	1,55	1,42	3,44	2,49	0,56	0,51	1,24	2,84	2,05	2,43
	1,37	1,18	1,54	0,22	3,17	2,46	1,41	1,2	1,57	1,19	2,86	1,22
Bio-Skin	1,79	2,42	1,28	0,28	1,24	0,9	1,64	0,56	1,24	3,41	2,08	0,64
	2,84	1,69	0,29	0,39	1,06	2,2	1,38	0,38	1,38	0,88	2,4	1,02
	0,24	1,72	1,17	0,85	1,2	0,81	1,67	0,47	1,84	1,5	2,11	0,44
	0,56	1,41	1,19	0,64	2,58	1,08	2,5	0,74	0,28	1,33	1,52	0,94
	0,49	1,24	1,28	0,31	2,41	1,55	2,16	0,8	1,96	0,61	0,71	0,65
	4,17	1,15	1,29	0,85	0,65	1,51	1,42	1,08	1,36	1,7	2,48	0,86
	3,02	2,05	1,34	0,85	2,07	0,91	1,91	0,22	3,93	1,15	2,99	1,74
	0,49	1,35	1,12	0,42	1,24	1,15	1,19	0,82	1,95	1,4	1,98	0,55
	2,98	1,59	1,64	0,62	3,23	1,62	1,23	1,35	4,12	0,77	2,04	1,01
	2,52	1,78	1,41	0,39	1,74	2,04	1,46	0,89	2,19	0,73	1,95	0,27

Apêndice E – Valores de dureza (em unidades Shore A) do silicone MDX 4-4210 em função da pigmentação GC, GP, GO, GPO antes (Ti) e após os protocolos de higiene (Tf) EA, ERc10% e ECI0,12%, bem como a variação no período ($T_f - T_i$).

	GC			GP			GO			GPO		
	Ti	T _f	T _f -Ti	Ti	T _f	T _f -Ti	Ti	T _f	T _f -Ti	Ti	T _f	T _f -Ti
EA	51,4	51,8	0,4	51,6	57,4	5,8	51	53	2	55,6	54,4	-1,2
	50	53,8	3,8	49,8	55,4	5,6	53,6	55,6	2	51,8	50,8	-1
	50	54	4	53,2	56,4	3,2	55,2	56,6	1,4	56,4	53,2	-3,2
	52,4	53,2	0,8	51,4	54	2,6	52	52	0	54,2	53,6	-0,6
	57,8	56,2	-1,6	51,4	54,8	3,4	53,6	56	2,4	51,4	54,2	2,8
	52,6	56,4	3,8	52,6	52,8	0,2	55,8	54	-1,8	56,4	52	-4,4
	52	55,8	3,8	52,2	52,2	0	51,8	53,4	1,6	54,2	45,2	-9
	53,4	53,6	0,2	50,6	54,4	3,8	51,4	53,6	2,2	56,4	51,2	-5,2
	53,2	54,2	1	53,8	54	0,2	55	54,6	-0,4	55	50,8	-4,2
	54,6	54,6	0	53	55	2	54,2	50,4	-3,8	54,4	56	1,6
ERc10%	52,6	52,4	-0,2	50,8	55	4,2	53,4	52	-1,4	59,2	56,6	-2,6
	53,4	58,4	5	53,6	55	1,4	53,2	54,4	1,2	56	56,8	0,8
	52,4	56,4	4	54	54,6	0,6	52,8	53,6	0,8	49,6	52,8	3,2
	50	58	8	51,6	56,2	4,6	53	54,6	1,6	51,8	55,2	3,4
	53	54,8	1,8	53	53,6	0,6	50,2	53	2,8	48,4	54	5,6
	53,6	56	2,4	56	54	-2	49	52,6	3,6	55,4	51,2	-4,2
	52	53	1	54,6	55,8	1,2	53,2	56,6	3,4	54,4	54	-0,4
	53,6	55,4	1,8	53,2	55,4	2,2	53,4	52,2	-1,2	54,4	55,2	0,8
	50,2	54,6	4,4	52,8	56	3,2	50,6	54,4	3,8	53,8	52,2	-1,6
	56	54,8	-1,2	55,6	52,2	-3,4	50,8	49,8	-1	56,2	53	-3,2
ECI0,12%	54,2	55,4	1,2	50	53,2	3,2	50,4	52,4	2	52,4	53,2	0,8
	53,2	56	2,8	51	58	7	54,2	50,6	-3,6	53,8	52,6	-1,2
	54,2	53,8	-0,4	51	55,8	4,8	58	54,8	-3,2	57,6	55,8	-1,8
	52,4	54,2	1,8	51,8	55,6	3,8	55,2	54,2	-1	53,4	55,8	2,4
	52,2	52,2	0	54,6	56	1,4	52,6	54,2	1,6	57,8	58,8	1
	51,6	52,4	0,8	53	51,6	-1,4	52,8	54	1,2	54,8	55,4	0,6
	52,6	55,2	2,6	50,8	55,8	5	51,4	52	0,6	51	54,2	3,2
	55,2	53,4	-1,8	57	53,2	-3,8	51,4	52,8	1,4	51,4	49,2	-2,2
	55	56,2	1,2	52,2	54,8	2,6	55,6	55,6	0	50,8	52,4	1,6
	53,4	53,2	-0,2	53,6	51	-2,6	56,4	54,6	-1,8	54,6	54,6	0

Apêndice F – Valores de dureza (em unidades Shore A) do silicone Bio-Skin em função da pigmentação GC, GP, GO, GPO antes (Ti) e após os protocolos de higiene (Tf) EA, ERc10% e EC10,12%, bem como a variação no período ($T_f - T_i$).

	GC			GP			GO			GPO		
	Ti	T _f	T _f -Ti	Ti	T _f	T _f -Ti	Ti	T _f	T _f -Ti	Ti	T _f	T _f -Ti
EA	70,8	67,4	-3,4	70,2	70,4	0,2	71,6	68,4	-3,2	70,4	69,4	-1
	73,8	70,6	-3,2	73,8	73	-0,8	70,6	67	-3,6	69,2	71,8	2,6
	68,8	71	2,2	68,6	71	2,4	69,8	67,2	-2,6	70,2	69,2	-1
	70	65,6	-4,4	72,6	72,8	0,2	68,4	65,4	-3	70	70,2	0,2
	72,2	72,2	0	72,6	69,8	-2,8	66,6	66,8	0,2	70,4	69,6	-0,8
	70,6	63,6	-7	71,2	69,6	-1,6	72,6	66,8	-5,8	70,6	67,6	-3
	69,4	68,2	-1,2	74,2	70,6	-3,6	69,8	62,6	-7,2	73,2	63,8	-9,4
	73,8	70,2	-3,6	71,8	69	-2,8	70,4	69	-1,4	71,8	68,4	-3,4
	72	67,2	-4,8	73	69,8	-3,2	70,2	65,8	-4,4	70,2	67	-3,2
	73,4	64,4	-9	76,2	73,8	-2,4	66,8	66,4	-0,4	68,2	67,2	-1
ERc10%	72	70,6	-1,4	67,8	69,2	1,4	72	58,6	-13,4	72,8	70,4	-2,4
	65,4	66,6	1,2	71,8	71,4	-0,4	69,2	66,6	-2,6	71	69,4	-1,6
	71,2	68,8	-2,4	72,8	70,4	-2,4	68,4	70,8	2,4	72,2	70	-2,2
	72,4	69,8	-2,6	73,4	73,2	-0,2	71,6	63,8	-7,8	71,6	68	-3,6
	73,4	68	-5,4	71	72	1	66,8	68,8	2	70	69,2	-0,8
	75,4	65	-10,4	70,6	71,4	0,8	69,6	68,4	-1,2	70,4	67,6	-2,8
	71,8	71,2	-0,6	70,4	72,6	2,2	68,4	70,4	2	68,8	70,6	1,8
	67,4	70	2,6	73,6	72,2	-1,4	69,8	67,6	-2,2	72,2	70	-2,2
	72,6	69,8	-2,8	71,4	67,6	-3,8	69,4	71,6	2,2	74,8	69	-5,8
	69,6	67,4	-2,2	65,6	72	6,4	70,4	69,4	-1	71,2	69,8	-1,4
EC10,12%	72,6	66,6	-6	70	71,8	1,8	68	67,2	-0,8	70,4	66,8	-3,6
	71,8	70,4	-1,4	70,4	70,4	0	64,4	65,4	1	72,8	68,6	-4,2
	69,2	70	0,8	69,6	72	2,4	67,6	68	0,4	69,6	69,2	-0,4
	70,4	68,8	-1,6	72,6	70	-2,6	59,6	65,4	5,8	73,2	69,6	-3,6
	71	70,2	-0,8	71	73,6	2,6	66	66	0	72,2	67,8	-4,4
	64,8	71	6,2	72,4	70	-2,4	69,4	68,2	-1,2	69,2	67,8	-1,4
	70,8	69,4	-1,4	69	72,4	3,4	63,6	67	3,4	75,6	67	-8,6
	72,4	71	-1,4	69,4	71,4	2	66	66	0	69,4	67,8	-1,6
	71,6	70	-1,6	68,2	72,2	4	70,2	62,8	-7,4	69,8	67,4	-2,4
	69,8	69,8	0	71	70,2	-0,8	69,2	68,6	-0,6	69,4	66,2	-3,2

Apêndice G – Valores de rugosidade (micrômetros) do silicone MDX 4-4210 em função da pigmentação GC, GP, GO, GPO antes (Ti) e após os protocolos de higiene (Tf) EA, ERc10% e EcL0,12%, bem como a variação no período (T_f - T_i).

	GC			GP			GP			GPO		
	Ti	Tf	Tf - Ti	Ti	Tf	Tf - Ti	Ti	Tf	Tf - Ti	Ti	Tf	Tf - Ti
EA	0,65	0,37	-0,28	0,61	0,47	-0,14	0,82	0,63	-0,19	0,43	0,63	0,20
	0,99	0,43	-0,56	0,33	0,41	0,08	0,40	0,57	0,17	0,32	0,48	0,16
	0,30	0,51	0,21	0,30	0,38	0,08	0,72	0,24	-0,48	0,51	0,45	-0,06
	0,18	0,32	0,14	0,49	0,45	-0,04	0,36	0,68	0,32	0,43	0,61	0,18
	0,59	0,41	-0,18	0,31	0,24	-0,07	0,51	0,47	-0,04	0,47	0,42	-0,05
	0,18	0,43	0,25	0,35	0,32	-0,03	0,87	0,51	-0,36	0,71	0,59	-0,12
	0,67	0,32	-0,35	0,39	0,39	0,00	0,59	0,59	0,00	0,62	0,44	-0,18
	0,42	0,48	0,06	0,37	0,30	-0,07	0,52	0,49	-0,03	0,41	0,77	0,36
	0,42	0,38	-0,04	0,36	0,33	-0,03	0,70	0,47	-0,23	0,58	0,51	-0,07
	0,37	0,38	0,01	0,25	0,54	0,29	0,57	0,72	0,15	0,51	0,72	0,21
ERc10%	0,77	0,41	-0,36	0,34	0,48	0,14	0,75	0,73	-0,02	0,53	0,51	-0,02
	0,39	0,40	0,01	0,38	0,35	-0,03	0,49	0,66	0,17	0,44	0,55	0,11
	0,37	0,53	0,16	0,44	0,32	-0,12	0,71	0,68	-0,03	0,86	0,48	-0,38
	0,51	0,48	-0,03	0,31	0,42	0,11	0,74	0,42	-0,32	0,46	0,60	0,14
	0,26	0,31	0,05	0,47	0,41	-0,06	0,65	0,64	-0,01	0,82	0,51	-0,31
	0,24	0,40	0,16	0,45	0,59	0,14	0,76	0,79	0,03	0,75	0,45	-0,30
	0,64	0,36	-0,28	0,44	0,26	-0,18	0,93	0,56	-0,37	0,77	0,44	-0,33
	0,57	0,46	-0,11	0,41	0,37	-0,04	0,66	0,57	-0,09	0,78	0,59	-0,19
	0,86	0,61	-0,25	0,28	0,35	0,07	0,53	0,85	0,32	0,61	0,43	-0,18
	0,27	0,36	0,09	0,50	0,65	0,15	0,74	0,85	0,11	0,89	0,67	-0,22
EcL0,12%	0,45	0,42	-0,03	0,36	0,48	0,12	0,82	0,65	-0,17	0,91	0,54	-0,37
	0,61	0,48	-0,13	0,31	0,48	0,17	0,67	0,80	0,13	0,41	0,60	0,19
	0,71	0,45	-0,26	0,36	0,43	0,07	0,57	0,72	0,15	0,49	0,49	0,00
	0,51	0,32	-0,19	0,31	0,33	0,02	0,75	0,55	-0,20	0,20	0,51	0,31
	0,59	0,44	-0,15	0,49	0,38	-0,11	0,48	0,51	0,03	0,64	0,50	-0,14
	0,61	0,46	-0,15	0,69	0,53	-0,16	0,50	0,70	0,20	0,34	0,75	0,41
	0,57	0,36	-0,21	0,39	0,60	0,21	1,02	0,49	-0,53	0,45	0,61	0,16
	0,48	0,31	-0,17	0,35	0,47	0,12	0,93	0,54	-0,39	0,59	0,35	-0,24
	0,32	0,34	0,02	0,50	0,54	-0,04	0,63	0,47	-0,16	0,43	0,51	0,08
	0,67	0,43	-0,24	0,54	0,40	-0,14	0,70	0,37	-0,33	0,48	0,42	-0,06

Apêndice H – Valores de rugosidade (micrômetros) do silicone Bio-Skin em função da pigmentação GC, GP, GO, GPO antes (Ti) e após os protocolos de higiene (Tf) EA, ERc10% e ECl0,12%, bem como a variação no período (Tf - Ti).

	GC			GP			GO			GPO		
	Ti	Tf	Tf - Ti	Ti	Tf	Tf - Ti	Ti	Tf	Tf - Ti	Ti	Tf	Tf - Ti
EA	0,62	1,96	1,34	0,92	0,71	-0,21	1,17	1,15	-0,02	1,55	0,93	-0,62
	2,16	0,71	-1,45	0,85	0,84	-0,01	1,45	1,41	-0,04	0,73	0,4	-0,33
	1,06	0,91	-0,15	0,73	0,61	-0,12	0,5	0,45	-0,05	0,83	0,97	0,14
	1,01	1,76	0,75	0,53	0,58	0,05	1,24	1,17	-0,07	1,06	0,87	-0,19
	2,28	1,57	-0,71	0,54	0,71	0,17	0,69	0,83	0,14	1,15	0,43	-0,72
	1,83	1,28	-0,55	0,44	0,76	0,32	1,93	1,8	-0,13	0,48	0,53	0,05
	1,35	2,51	1,16	1,81	1,34	-0,47	0,89	0,84	-0,05	1,34	0,7	-0,64
	0,84	0,99	0,15	0,69	0,62	-0,07	0,98	1,2	0,22	0,62	0,56	-0,06
	2,47	0,95	-1,52	0,63	0,81	0,18	0,84	1,14	0,30	2	0,89	-1,11
	1,29	0,87	-0,42	0,67	1,01	0,34	1,07	1,54	0,47	2,77	1	-1,77
ERc10%	0,7	0,58	-0,12	0,36	0,66	0,30	3,13	0,81	-2,32	1	0,48	-0,52
	3,34	1,67	-1,67	1,81	1,01	-0,80	0,61	0,91	0,30	1,61	0,67	-0,94
	1,09	0,8	-0,29	0,55	0,88	0,33	0,99	1,05	0,06	0,89	0,73	-0,16
	1,44	1	-0,44	0,62	0,64	0,02	1,97	1,85	-0,12	0,93	0,67	-0,26
	1,62	1,26	-0,36	0,27	0,53	0,26	1,35	1,61	0,26	0,89	0,61	-0,28
	1,44	2,63	1,19	2,43	1,31	-1,12	0,76	1,61	0,85	1,43	0,61	-0,82
	0,63	0,57	-0,06	0,53	0,49	-0,04	1,45	0,62	-0,83	1,26	1,08	-0,18
	1,45	1,64	0,19	1,32	0,73	-0,59	2,15	1,79	-0,36	0,82	0,66	-0,16
	0,4	0,55	0,15	0,42	0,63	0,21	1,54	1,15	-0,39	1,1	1,09	-0,01
	3,24	2,19	-1,05	0,57	0,83	0,26	0,64	1,06	0,42	0,7	0,59	-0,11
ECl0,12%	2,6	1,7	-0,90	1,09	1,27	0,18	1,19	0,66	-0,53	1,48	1,58	0,10
	1,14	1,08	-0,06	0,44	0,72	0,28	0,94	0,86	-0,08	0,63	1	0,37
	2,71	0,85	-1,86	0,38	0,64	0,26	1,16	1,63	0,47	0,74	0,79	0,05
	1,01	1,51	0,50	0,59	0,56	-0,03	2,52	0,51	-2,01	1,36	0,74	-0,62
	0,98	1,46	0,48	1,91	0,84	-1,07	2,26	1,45	-0,81	0,83	0,85	0,02
	1,29	2,41	1,12	0,93	0,55	-0,38	1,1	1,61	0,51	1,32	0,91	-0,41
	2,73	1,05	-1,68	1,36	1,73	0,37	1,38	0,97	-0,41	0,81	0,64	-0,17
	1,57	0,66	-0,91	1,21	0,7	-0,51	2,47	1,54	-0,93	0,66	0,44	-0,22
	0,67	1,07	0,40	0,54	0,64	-0,04	2,55	1,32	-1,23	0,98	0,82	-0,16
	0,96	0,63	-0,33	0,71	0,74	0,03	3,54	1,21	-2,33	0,68	0,77	0,09

Apêndice I - Valores das massas (em gramas) do silicone MDX 4-4210 dos grupos de pigmentação e protocolos de higiene, sendo M1: peso após obtenção dos espécimes; M2: peso após imersão nas soluções; M3: peso após higienização.

	GC			GP			GO			GPO		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
EA	0,4877	0,4878	0,4876	0,4565	0,4565	0,4563	0,4888	0,4992	0,4993	0,4451	0,4449	0,4447
	0,5041	0,5045	0,5039	0,4461	0,4463	0,4461	0,4895	0,4893	0,4894	0,5286	0,5286	0,5288
	0,4733	0,4733	0,4732	0,4713	0,4714	0,4711	0,4873	0,4875	0,4873	0,4613	0,4612	0,4611
	0,5084	0,5088	0,5081	0,5002	0,5002	0,4999	0,5558	0,5561	0,5558	0,4485	0,4483	0,4484
	0,4306	0,4307	0,4302	0,4971	0,4972	0,4969	0,5253	0,5256	0,5255	0,4197	0,4191	0,4194
	0,4581	0,4583	0,4579	0,5157	0,5158	0,5155	0,4779	0,478	0,4781	0,5342	0,5342	0,5341
	0,4403	0,4408	0,4405	0,4788	0,4788	0,4782	0,4933	0,4934	0,4934	0,4905	0,4901	0,4905
	0,4203	0,4202	0,4203	0,5289	0,5291	0,5284	0,4949	0,4948	0,495	0,4922	0,4921	0,4921
	0,4731	0,4731	0,4724	0,4654	0,4657	0,4651	0,4782	0,4787	0,4784	0,4882	0,4844	0,4883
	0,4846	0,4846	0,4842	0,5153	0,5153	0,5155	0,524	0,5242	0,5244	0,4645	0,4681	0,4644
ERc10%	0,4741	0,4751	0,4754	0,4896	0,4912	0,4911	0,5171	0,5188	0,5167	0,4172	0,4181	0,4183
	0,4816	0,4828	0,4826	0,487	0,489	0,4885	0,5148	0,5167	0,5188	0,4478	0,4492	0,4492
	0,441	0,4423	0,4421	0,4589	0,4606	0,4601	0,4861	0,4878	0,4875	0,5321	0,5337	0,5333
	0,4855	0,4868	0,4805	0,5363	0,5381	0,5353	0,4829	0,4847	0,4843	0,4486	0,4496	0,4494
	0,4298	0,4306	0,4366	0,5342	0,5357	0,5375	0,4884	0,4901	0,4807	0,4937	0,4947	0,4992
	0,4405	0,4421	0,4421	0,4926	0,4947	0,4941	0,4791	0,4798	0,4807	0,5444	0,5461	0,5457
	0,4884	0,4899	0,4897	0,4678	0,4693	0,4691	0,4851	0,4867	0,4862	0,4271	0,4281	0,4277
	0,4699	0,4709	0,4708	0,4637	0,4654	0,4649	0,4985	0,5004	0,5006	0,5121	0,5136	0,5132
	0,5023	0,5033	0,5031	0,4854	0,4871	0,4867	0,5121	0,5144	0,5199	0,5453	0,5465	0,5458
	0,4926	0,4941	0,4937	0,4813	0,4825	0,4824	0,4872	0,4891	0,4885	0,4884	0,4897	0,4896
ECi0,12%	0,4701	0,4718	0,4791	0,5612	0,5634	0,5615	0,5078	0,5096	0,5085	0,5381	0,5394	0,5384
	0,4847	0,4865	0,4847	0,5184	0,5199	0,5187	0,4987	0,5006	0,4994	0,4541	0,4557	0,4541
	0,4798	0,4813	0,4797	0,4873	0,4889	0,4875	0,4941	0,4965	0,4951	0,4156	0,4172	0,4157
	0,4465	0,4478	0,4464	0,5156	0,5172	0,5162	0,4896	0,4913	0,4902	0,4911	0,4925	0,4904
	0,4862	0,4872	0,4863	0,587	0,5891	0,5874	0,5021	0,5043	0,5041	0,4504	0,4516	0,4541
	0,49	0,4916	0,4901	0,6029	0,6053	0,6036	0,5226	0,525	0,5236	0,4739	0,4756	0,4799
	0,4983	0,4998	0,4981	0,5661	0,5687	0,5663	0,4938	0,4959	0,4951	0,5113	0,5132	0,5117
	0,4746	0,476	0,4745	0,5011	0,5029	0,5018	0,4822	0,4844	0,4831	0,5396	0,5421	0,5401
	0,4652	0,4665	0,4651	0,5105	0,5125	0,5111	0,4866	0,4887	0,4874	0,4494	0,4511	0,4496
	0,4654	0,4667	0,4654	0,4595	0,4613	0,4602	0,4606	0,4631	0,4618	0,5676	0,5694	0,5678

Apêndice J - Valores das massas (em gramas) do silicone Bio-Skin dos grupos de pigmentação e protocolos de higiene, sendo M1: peso após obtenção dos espécimes; M2: peso após imersão nas soluções; M3: peso após higienização.

	GC			GP			GO			GPO		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
EA	0,7349	0,7351	0,7334	0,7003	0,7006	0,6994	0,7981	0,7975	0,7824	0,6798	0,6796	0,6776
	0,6661	0,6655	0,6653	0,7137	0,7139	0,7125	0,8212	0,8207	0,8087	0,7444	0,7442	0,7414
	0,7282	0,7279	0,7223	0,6853	0,6852	0,6842	0,7834	0,7831	0,7732	0,7908	0,7903	0,7871
	0,7395	0,7395	0,7223	0,7431	0,7434	0,7413	0,7275	0,7277	0,7241	0,7857	0,7855	0,7821
	0,6819	0,6821	0,6852	0,7816	0,782	0,7806	0,8434	0,8433	0,8372	0,6685	0,6684	0,6672
	0,6702	0,6704	0,6768	0,7585	0,7585	0,7569	0,7839	0,7831	0,7723	0,802	0,8019	0,7987
	0,7848	0,7845	0,7791	0,6862	0,6856	0,6854	0,8398	0,8393	0,8263	0,6586	0,658	0,6562
	0,7388	0,7381	0,7331	0,7596	0,7596	0,7578	0,8437	0,8434	0,8286	0,7466	0,7464	0,7437
	0,6355	0,6351	0,6302	0,7298	0,7296	0,7288	0,8372	0,8376	0,8308	0,7549	0,7551	0,7527
	0,6977	0,6973	0,6924	0,753	0,7532	0,7517	0,7749	0,7751	0,7696	0,6498	0,6497	0,6485
ERc10%	0,7171	0,719	0,7177	0,7821	0,7854	0,7826	0,7126	0,7155	0,7137	0,8256	0,8285	0,8264
	0,6613	0,6626	0,6617	0,6705	0,672	0,6703	0,8486	0,8517	0,8495	0,6784	0,6808	0,6797
	0,7179	0,7199	0,7185	0,6932	0,6948	0,6938	0,8264	0,8294	0,8274	0,8198	0,8224	0,8211
	0,695	0,6967	0,6959	0,6989	0,7008	0,6991	0,8202	0,8233	0,8216	0,6673	0,6693	0,6681
	0,6972	0,699	0,6979	0,7833	0,785	0,7831	0,7327	0,7358	0,7339	0,7844	0,7865	0,7853
	0,6904	0,6929	0,6919	0,6941	0,6968	0,6955	0,8325	0,8357	0,8329	0,818	0,8211	0,8188
	0,723	0,7258	0,7245	0,7654	0,7684	0,7675	0,8199	0,8235	0,8208	0,6898	0,6923	0,6907
	0,6979	0,7004	0,6985	0,7891	0,7917	0,7901	0,7951	0,7988	0,795	0,7746	0,7777	0,7761
	0,7459	0,7483	0,7466	0,7529	0,755	0,7539	0,7977	0,8208	0,7985	0,6768	0,6788	0,6776
	0,6614	0,6633	0,6623	0,6863	0,6881	0,6874	0,8175	0,8009	0,8181	0,8319	0,8346	0,8321
EC10,12%	0,6312	0,6333	0,6313	0,6722	0,6748	0,6722	0,8088	0,8124	0,8085	0,7707	0,7733	0,7701
	0,6635	0,6655	0,6633	0,7536	0,7562	0,753	0,7962	0,7995	0,7906	0,804	0,8065	0,8031
	0,6963	0,6983	0,6836	0,7622	0,7645	0,7613	0,8224	0,8259	0,8218	0,8016	0,8041	0,8011
	0,714	0,7161	0,7136	0,7415	0,7443	0,7408	0,7267	0,7304	0,7252	0,6695	0,6712	0,6695
	0,7351	0,7373	0,7391	0,6461	0,6488	0,6459	0,7991	0,8027	0,8021	0,8126	0,7848	0,7896
	0,6838	0,6863	0,6875	0,7916	0,7953	0,7995	0,8109	0,8155	0,8126	0,7803	0,7838	0,7813
	0,6876	0,6902	0,6958	0,7795	0,7831	0,7859	0,7737	0,7785	0,7784	0,8029	0,8066	0,7991
	0,6995	0,7014	0,7055	0,6963	0,6993	0,6966	0,8139	0,8194	0,8106	0,7995	0,8031	0,8024
	0,7261	0,7279	0,7295	0,7795	0,7824	0,7796	0,8221	0,8271	0,8135	0,6642	0,6671	0,6643
	0,7991	0,8016	0,8047	0,7011	0,7041	0,7013	0,7712	0,7762	0,7736	0,7448	0,7475	0,7445

Apêndice K – Contagens de UFC/10 mL (em log₁₀) após a exposição do silicone MDX4-4210 aos protocolos de higiene.

	<i>C. glabrata</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
A	5,25	7,29	4,81	5,81	4,81	4,97
	6,04	6,78	4,68	7,19	4,80	5,56
	5,63	7,36	5,11	7,29	3,49	5,76
	4,16	7,04	4,94	5,06	3,40	5,33
	5,61	6,97	5,12	6,71	4,89	5,59
	5,72	7,18	5,05	5,29	4,26	5,61
	5,65	7,10	5,39	6,02	4,23	5,89
	3,64	7,07	4,09	5,65	4,62	5,57
	4,61	7,14	5,65	6,56	3,92	5,43
Rc10%	4,52	4,74	4,16	5,91	3,62	4,80
	3,77	4,48	3,58	4,45	3,69	5,05
	3,02	3,83	4,72	5,20	3,64	4,78
	3,91	4,08	4,11	4,61	3,65	4,92
	4,50	4,30	4,59	5,19	3,61	4,86
	4,52	4,75	3,63	4,74	3,55	5,02
	4,57	3,43	4,30	4,91	3,73	4,88
	3,94	4,72	4,43	4,13	3,70	4,82
	4,34	4,85	4,17	5,66	4,61	4,39
Cl0,12%	0,00	4,90	0,00	0,00	2,92	0,00
	0,00	5,53	0,00	0,00	3,02	0,00
	1,91	5,44	5,68	0,00	1,61	0,00
	0,00	5,41	0,00	1,91	2,21	0,00
	2,30	5,34	0,00	0,00	2,45	0,00
	1,91	5,42	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	5,11	0,00	2,78	1,61	0,00
	0,00	5,17	0,00	0,00	4,53	0,00
	0,00	5,41	0,00	1,61	0,00	0,00
E	2,51	3,59	6,31	5,21	2,98	4,43
	2,56	2,30	3,24	5,83	2,75	5,35
	2,94	2,75	2,96	5,55	2,88	3,25
	4,43	3,06	2,94	5,57	2,60	3,53
	2,81	2,56	3,12	5,77	2,30	3,47
	3,24	3,31	2,72	5,26	3,31	2,92
	2,92	3,02	2,83	5,52	4,29	3,69
	1,91	3,20	3,48	5,13	3,30	3,67
	2,75	3,13	2,96	5,61	3,79	3,74

Apêndice L - Contagens de UFC10 mL (em log₁₀) após a exposição do silicone Bio-Skin aos protocolos de higiene.

	<i>C. glabrata</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
A	5,33	5,38	5,64	5,27	5,24	5,61
	5,74	5,13	5,65	4,87	5,33	5,7
	5,62	5,52	5,96	5,39	5,34	5,92
	5,81	5,53	5,64	5,54	5,25	5,72
	5,54	5,75	5,17	5,62	5,99	5,23
	5,49	5,69	5,46	5,19	5,34	5,15
	5,51	5,33	5,67	5,25	5,56	5,47
	5,7	6,07	5,83	5,16	5,52	5,16
	5,2	5,34	5,26	5,26	5,43	5,87
Rc10%	5,81	5,79	5,79	5,94	5,57	5,39
	5,5	5,45	5,73	5,73	5,6	5,13
	5,05	5,38	5,87	5,55	5,45	4,75
	5,72	5,97	5,61	5,53	5,2	5,41
	5,72	5,97	5,57	5,41	5,65	5,72
	5,37	5,45	5,39	5,23	5,87	5,64
	5,27	5,99	5,31	5,43	5,14	5,34
	5,74	5,34	5,89	5,17	5,23	5,48
	4,83	5,92	5,37	5,03	4,92	4,45
Cl0,12%	5,16	5,18	5,57	4,72	4,84	5,26
	4,08	5,35	5,74	5,29	4,85	4,51
	5,24	4,51	4,08	0	5,45	0
	0	5,35	3,6	5,54	5,27	0
	5,76	0	5,09	0	5,64	0
	4,3	5,85	5,03	5,18	5,16	0
	5,55	4,98	4,98	5,82	5,15	3,6
	4,68	4,3	5,03	4,08	5,41	0
	4,88	5,94	5,05	4,08	5,49	0
E	5,17	5,13	5,27	5,49	5,67	5,09
	5,69	5,31	5,53	5,02	5,26	5,41
	5,27	4,38	5,48	5,17	5,59	4,78
	4,38	5,82	4,75	5,52	5,91	4,3
	5,93	5,61	6	5,41	5,93	5,37
	5,57	5,58	5,8	5,39	4,51	5,21
	4,38	5,8	5,68	5,68	5,88	5,39
	5,47	4,98	5,13	5,78	5,16	5,2
	5,41	5,77	5,7	5,51	5,03	5,75

Apêndice M – Resultado da análise de variância para *C. glabrata* tendo como fatores de variação protocolos de higiene x materiais.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	P
Material (M)	28,867	1	28,867	36,337	,000
Protocolos de higiene (Pr)	110,829	3	36,943	46,503	,000
M*Pr	13,436	3	4,479	5,638	,002
Erro	50,843	64	,794		
Total	1267,887	72			

Apêndice N – Resultado da análise de variância para *S. aureus* tendo como fatores de variação protocolos de higiene x materiais.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	P
Material (M)	2,376	1	2,376	4,601	,036
Protocolos de higiene (Pr)	42,151	3	14,050	27,207	,000
M*Pr	44,686	3	14,895	28,844	,000
Erro	33,051	64	,516		
Total	2009,292	72			

Apêndice O – Resultado da análise de variância para *S. mutans* tendo como fatores de variação protocolos de higiene x materiais.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	P
Material (M)	11,053	1	11,053	7,248	,009
Protocolos de higiene (Pr)	153,181	3	51,060	33,483	,000
M*Pr	5,981	3	1,994	1,307	,280
Erro	97,598	64	1,525		
Total	1248,688	72			

Apêndice P – Resultado da análise de variância para *P. aeruginosa* tendo como fatores de variação protocolos de higiene x materiais.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	P
Material (M)	,746	1	,746	,820	,369
Protocolos de higiene (Pr)	201,434	3	67,145	73,779	,000
M*S	17,491	3	5,830	6,406	,001
Erro	58,245	64	,910		
Total	1696,497	72			

Apêndice Q – Resultado da análise de variância para *E. faecalis* tendo como fatores de variação protocolos de higiene x materiais.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	P
Material (M)	18,020	1	18,020	23,549	,000
Protocolos de higiene (Pr)	36,845	3	12,282	16,050	,000
M*Pr	3,428	3	1,143	1,493	,225
Erro	48,974	64	,765		
Total	1146,644	72			

Apêndice R – Resultado da análise de variância para *E. coli* tendo como fatores de variação protocolos de higiene x materiais.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	P
Material (M)	,022	1	,022	,056	,813
Protocolos de higiene (Pr)	238,959	3	79,653	202,998	,000
M*Pr	7,184	3	2,395	6,103	,001
Erro	25,113	64	,392		
Total	1180,220	72			

Anexo A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FORP-USP.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 317.348

pelos pacientes, fazendo com que a prótese seja facilmente deteriorada e necessite de trocas periódicas. Esta longevidade limitada faz com que os pacientes retornem frequentemente ao serviço de atendimento para substituição de suas próteses, gerando desgaste para o paciente e elevados custos para o serviço público. Assim, o projeto de pesquisa descrito na presente proposta irá beneficiar diretamente os pacientes e a sociedade, fazendo com que os pacientes tenham acesso a soluções desinfetantes específicas e eficazes na remoção do biofilme facial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem embasada e justifica sua realização.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequadamente construídos.

Recomendações:

Nada a relatar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a relatar.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 149ª Reunião do CEP/FORP.

RIBEIRÃO PRETO, 26 de Junho de 2013

Assinador por:
Ana Maria Razaboni
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3802-0251

Fax: (16)3802-4102

E-mail: cep@forp.usp.br