

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/06/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia

BRUNO GUANDALINI CUNHA

Análise *in vitro* do extrato de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de enxaguatórios bucais comerciais sobre propriedades físicas e microbiológicas de materiais utilizados na confecção de prótese tipo protocolo

Araçatuba

2017

BRUNO GUANDALINI CUNHA

Análise *in vitro* do extrato de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de enxaguatórios bucais comerciais sobre propriedades físicas e microbiológicas de materiais utilizados na confecção de prótese tipo protocolo

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Biomateriais.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Prof. Ass. Dra. Cristiane Duque

Araçatuba

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C972a Cunha, Bruno Guandalini.
Análise *in vitro* do extrato de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de enxaguatórios bucais comerciais sobre propriedades físicas e microbiológicas de materiais utilizados na confecção de prótese tipo protocolo / Bruno Guandalini Cunha. - Araçatuba, 2017
152f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Profa. Cristiane Duque

1. *Cymbopogon* 2. Prótese total 3. Resinas acrílicas
4. Desinfecção 5. Teste de materiais 6. Propriedades físicas
7. Biofilmes 8. *Staphylococcus aureus* 9. *Candida albicans*
I. T.

Black D15
CDD 617.6

DADOS

CURRICULARES

BRUNO GUANDALINI CUNHA

Nascimento: 27/08/1991 – Tupã/SP

Filiação: Gilmar Cunha e Selma Guandalini Cunha

*2010-2014 - Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista).

*2013-2014 - Iniciação científica com bolsa PROPE-UNESP.

*2015 – Mestrado em Ciências Odontológicas, área de Biomateriais. (FOA-UNESP). Com bolsa de mestrado CNPq.

*2016 – Especialização em Endodontia (FOA-UNESP).

Associações – CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo

SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

APCD – Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra ao meu avô Mário da Cunha, homem íntegro e de caráter, no qual me inspiro. Sua existência neste plano foi essencial para a minha formação, não só profissional, mas também pessoal, pois seu esforço imensurável e incansável em fazer seus três filhos serem pessoas de bem, através do estudo e trabalho ético, foi passado à minha geração.

Até mesmo sua partida deste plano há pouco tempo, nos deixou lições. A família Cunha de geração em geração vai conhecer tudo que ensinastes. Sei que o senhor me acompanha e ouve minhas preces, sendo assim, fico feliz em dedicar toda esta obra, sem exceção, à sua memória.

Te amo, vô Mário.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a Deus, por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho, pela dedicação em tornar o nosso ambiente o mais confortável e seguro possível para a pesquisa e ensino.

Às empresas VIPI - produtos odontológicos e Ivoclar Vivadent, por ter cedido os materiais que foram essenciais para a realização deste estudo.

À empresa Oximed, responsável pela esterilização a óxido de etileno dos materiais sensíveis ao calor. Agradeço a gentileza de voluntariamente realizar estas esterilizações sem nenhum custo.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado. Fico honrado de ser bolsista através desta instituição, e firmo que todo investimento foi compensado com a minha dedicação e de todos envolvidos neste trabalho.

Aos porteiros e funcionários pela atenção e ajuda prestada a mim durante todo o meu trabalho, pelo fato da pesquisa ocorrer meio à madrugada de vários dias, particularmente ao Sr. Carlos, que acabou se tornando um amigo, que de forma muito educada e atenciosa olhava o cansaço de passar a madrugada trabalhando, e sempre dizia coisas boas e confortantes que mudava o meu dia. Aos técnicos de laboratório, por facilitarem o trabalho, e manterem o laboratório sempre disponível para que possamos produzir.

Ao programa de pós-graduação em Ciência Odontológica, e também aos mestres de várias disciplinas que cursei durante este mestrado. Meu aprendizado foi ímpar, agradeço por contribuírem com a minha formação didática e científica.

Ao Departamento de Odontopediatria por me receber como aluno de pós-graduação, e também a todos os mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos deste departamento, onde criei várias amizades. Principalmente à Karina, uma pessoa sem precedentes! Mal me conhecia e me ajudava como se fosse seu orientado, com diluições e plaqueamentos nas várias madrugadas. Sei que seu futuro está garantido, minha amiga! Necessito, sem dúvidas, agradecer também à Juliana, que foi a minha tutora no início dos trabalhos no laboratório de microbiologia. Juliana e Karina, vocês foram as minhas mentoras do mundo microbiológico. Muito Obrigado!

Deixo aqui meus agradecimentos também ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, onde passei grande parte deste mestrado polimerizando, polindo materiais e obtendo a ajuda primordial do técnico em prótese dentária Sr. Eduardo Cobo, que com seus dons protéticos, me ajudou a realizar um dos passos mais difíceis deste trabalho: Confeção e polimento das amostras em metal. Tive um aprendizado fora do padrão, pude ver de perto e na prática o método de fundição. Agradeço muito também à doutoranda em prótese Emily, por ter contribuído com seu tempo e seu conhecimento estatístico em grande parte deste trabalho, tenho certeza que será uma ótima professora, obrigado por tudo!

Agradeço o Departamento de Ciências Básicas, no nome da Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira da disciplina de farmacologia por disponibilizar o espaço e equipamentos para a cultura de células e também ressaltar a disponibilidade e paciência da doutoranda Loiane, que me auxiliou na parte de citotoxicidade, essencial para que este trabalho tivesse embasamento para as próximas pesquisas utilizando a citronela como enxaguatório.

À professora Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida por aceitar o convite de ser avaliadora da minha dissertação de mestrado. Fico muito honrado por tê-la neste dia tão importante, contribuindo com a sua experiência para o nosso trabalho.

À Profa. Dra. Daniela Micheline dos Santos, pelo apoio incondicional a este trabalho. Agradeço também por ter aceitado o convite de ser a minha avaliadora do EGQ. Reitero meus agradecimentos também ao Prof. Dr. Marcelo Coelho Goiato, que também sempre acrescentou ao nosso trabalho, e por ter aceito ser um dos avaliadores da minha defesa de dissertação.

Ao Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro, por ter contribuído com críticas valiosas no meu EGQ. E também pelo apoio com materiais que foram primordiais a este trabalho. Colocou-se no nosso lugar, e não teve dúvidas em compartilhar não só itens físicos, mas também o conhecimento.

Incluo também a Profa. Dra. Christine Men Martins, por ter aceitado compor a banca suplente da minha dissertação, junto com a Profa. Dra. Daniela Micheline dos Santos.

Não tenho palavras para agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti. Demorei muito tempo para encontrar as palavras certas, vou tentar colocá-las neste papel.

Ao acaso do destino, a senhora me deu a oportunidade de aprender ciência em 2013, e desde então só me proporcionou outras oportunidades, como ser a minha orientadora do TCC e minha grande tutora de mestrado. Fico muito, mas muito honrado de ser o seu primeiro aluno de mestrado, e será uma coisa que levarei pro resto da minha vida. Lembro como se fosse ontem a idéia que me deu em concorrer à vaga do mestrado no meio do ano de 2015, e sei que a responsabilidade da senhora era muito grande em relação a esta vaga, e eu tinha que mostrar com meu trabalho que estava comprometido com este dever. Tomara que tenha atingido as suas expectativas, e fico muito feliz da colheita de resultados que tivemos durante este período de mestrado, tanto no nosso trabalho como nas publicações. Outro ponto é a compaixão e o cuidado que teve comigo durante este tempo, às vezes relatava um problema que estava passando, e desde então se preocupava com aquilo, e sempre perguntava se estava

tudo certo ou então, quando estava desanimado, sempre conversava comigo e me animava. A senhora também sempre esteve disposta a enfrentar os problemas, e que problemas! Iniciamos o meu mestrado em uma época onde nosso país estava começando a decair meio à crise. Não tivemos nenhum auxílio do governo e tiramos o dinheiro dos nossos bolsos para fazer acontecer. Não sei quantas orientadoras fariam o mesmo que a senhora fez por mim. Aprendi muito não só na parte prática da pesquisa, mas também na escrita, sempre com muito cuidado avaliava o que eu fazia, e me mostrava o que ficaria melhor no texto. Invejo e tento me espelhar na leveza e objetividade das palavras com que redige um artigo, resultado de muito estudo e conhecimento. Quero que saiba que a senhora pode contar sempre comigo, independente da área que pretendo seguir. Meus agradecimentos foram sucintos em palavras, mas imensos na gratidão de tê-la como minha orientadora de mestrado.

Agradeço também à minha co-orientadora Profa. Dra. Cristiane Duque, o dom e experiência que a senhora tem com a microbiologia é invejável. Confesso que até atingirmos o que precisávamos no nosso trabalho demandou muito tempo e esforço, porém recompensante. Realmente foi a minha co-orientadora, e um dos pilares deste trabalho. Tenho que só agradecer à senhora e a Profa. Aimée pelo grupo que formamos, e que de forma leve e amistosa, conseguimos concluir este trabalho com muito embasamento e ótimos resultados.

À minha *Teacher* Maria Helena Rosanti Sugahara Medeiros Lima, pelas aulas preparatórias para o teste de proficiência em língua inglesa. Sua ajuda foi primordial para que pudesse chegar a este final de mestrado.

Agradeço aos alunos de iniciação científica: Allan, Marynara, Gabriela e Ary por terem contribuído com este trabalho. Cada um ajudou de uma forma ímpar, e torço muito pelo sucesso de vocês! Espero também que este trabalho tenha servido de aprendizado neste primeiro contato com a pesquisa científica.

À minha namorada Vanessa Bernardes, pelo amor e carinho. Você é uma das pessoas que mais sabe a dedicação e tempo que foi aplicado neste “projeto de vida” denominado pós-graduação. Obrigado por tudo que tem feito por mim, pelo apoio nos momentos de dificuldade e por sempre entender o motivo de não estarmos juntos em alguns momentos por conta dos deveres que tinha. Te amo. De maneira alguma posso deixar de citar a sua família, a qual posso chamar de minha segunda família. Sei que estou aqui hoje devido ao esforço de muitas pessoas, mas sem vocês nada teria acontecido. Obrigado por me acolherem sempre com carinho, principalmente no início do meu mestrado. Só vocês sabem as minhas idas e vindas naquela fase de transição. Não tenho palavras para agradecer como deveria. Aproveito também para agradecer os nossos amiguinhos felinos Tufão e Oliver. A paz destes pequenos seres nos traz a leveza e a pureza depois de um dia duro de trabalho, e a perda desses pequenos seres, inevitavelmente nos abala e nos deixa tristes até hoje, mas devemos sempre lembrar nos momentos bons que passamos com o Tufão.

A todos os meus amigos de infância, André, Vinícius, Pedro, Guilherme, Leonardo e Júlio. Pessoas com quem dividi uma grande parte da minha vida, uma época que nunca vou me esquecer.

Aos meus amigos de república da minha graduação, que nestes 5 anos de faculdade me presenteou com pessoas que jamais vou me esquecer, sendo eles: Eduardo, Thiago, Rodrigo, Jorge, Laércio, Milton e claro a Marilene, a quem tenho muitas saudades.

Aos membros da minha segunda república e atual: Renan, Ronaldo e Luis Felipe pelo companheirismo do dia a dia. Vocês me acolheram em uma época difícil, onde toda a minha mudança tinha sido feita para Tupã. Recomeçar do zero não foi fácil, mas ter vocês que foram meus companheiros de turma, se tornou mais tranquilo e seguro.

As minhas amigas de faculdade que levo até hoje: Hiskell, Jéssica e Marcela Ito. Mesmo depois de formados, mantivemos o nosso contato quando havia disponibilidade, vocês fizeram parte desta nova etapa da minha vida, obrigado a vocês todas!

Aos meus avôs Wilson e Elza, vocês me criaram e me deram amor, incondicionalmente. Vocês também são pilares do que sou hoje, e caso seja aprovado, compartilharei o meu título de mestre com vocês, que foram os meus mestres. Com muita saudade, agradeço também ao meu avô Mário, ao qual as palavras já foram escritas em minha dedicatória. Sei que o senhor está muito contente por estar finalizando esta etapa, e que está em um lugar muito bom, rodeado de amigos, familiares e pela avó Gilda, sua esposa, que também deixo explícito o meu agradecimento por ter cuidado de mim quando pequeno.

Aos meus tios e primos, principalmente minha prima Carolina, docente, que sempre me apoiou, além de servir como um espelho para o meu crescimento.

Ao meu irmão Thiago e minha cunhada Brunna, fico feliz de tê-los comigo nesta caminhada, e também por fazerem de tudo para virem à Araçatuba assistir minha defesa. Vocês não sabem como isso me deixa feliz!

Aos meus pais Gilmar e Selma, pelo apoio incondicional desde quando surgiu a idéia de realizar o mestrado, e por nunca questionar o fato de ter que me deslocar novamente para Araçatuba. Sei que isso envolveu várias coisas, dentre elas a parte financeira. Nunca imaginaria voltar e fazer mestrado, mais ainda voltando para Tupã com todas as mudanças e investimentos feitos por vocês posterior à minha formação. Obrigado por terem confiado em mim nesta nova etapa da minha vida. Obrigado pela paciência, pelos conselhos e pela boa vontade em sempre suprir minhas necessidades, pensando no meu futuro, como exemplos de pais zelosos. Tenho muita sorte por ter pais maravilhosos como vocês, que sempre me apoiaram na busca pelos meus objetivos. Se tudo der certo vocês também serão mestres junto comigo. Amo vocês.

Por fim, deixo aqui meus agradecimentos a cada pessoa que posso ter deixado passar, que contribuiu mesmo com gestos de afeto e amizade para que este trabalho chegasse a sua conclusão.

EPÍGRAFE

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.”

Chico Xavier

*RESUMO GERAL EM
PORTUGUÊS*

CUNHA, B.G. **Análise *in vitro* do extrato de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de enxaguatórios bucais comerciais sobre propriedades físicas e microbiológicas de materiais utilizados na confecção de prótese tipo protocolo.** 2017. Trabalho de dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO GERAL

O uso de soluções enxaguatórias é uma ferramenta no controle de patologias relacionadas ao uso de próteses. A efetividade antimicrobiana e citotoxicidade de alguns enxaguatórios comercialmente disponíveis ainda são questionadas, tornando a fitoterapia uma alternativa a ser pesquisada. Sendo assim, este estudo teve como objetivos: 1) avaliar *in vitro* a eficácia de formulações à base do extrato de citronela (CN) em biofilmes monoespécie em formação e formado, sobre amostras de resina acrílica ativada termicamente (RAAT) e liga de níquel-cromo (LNC), contaminadas por *S. aureus* e *C. albicans*, simulando uma prótese protocolo em meio bucal, em comparação com dois enxaguatórios comerciais sem etanol (LT – Listerine Zero e CHX – Periogard sem etanol); 2) avaliar *in vitro* a citotoxicidade das soluções em células epiteliais HaCat, simulando o contato com os enxaguatórios por 1 min; 3) avaliar, *in vitro*, o efeito de enxaguatórios bucais comerciais e da solução teste à base do óleo de CN a 10,9%, na alteração de rugosidade e cor de materiais utilizados na confecção de prótese tipo protocolo, sendo eles: duas marcas de dentes artificiais (DA - Trilux e Vivodent), RAAT e LNC. A alteração de cor da LNC não foi avaliada. Para o primeiro objetivo, após a obtenção da concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) da CN contra *S. aureus* e *C. albicans*, foram confeccionadas amostras de RAAT e LNC. A CBM/CFM da CN foi multiplicada por 5x e 10x para a formulação de dois enxaguatórios. As superfícies das amostras com o biofilme em formação (4 h de adesão) e formado (24 h) foram submetidas à ação das soluções à base de CN, Periogard sem etanol (CHX) e Listerine Zero (LT). A

simulação dos bochechos foi realizada em dois momentos diferentes, sendo a primeira simulação logo após o tempo de adesão de 4 h (biofilme em formação) e 24 h (biofilme formado), e a segunda simulação, 6 h após a primeira simulação, para cada microrganismo. O ensaio de citotoxicidade das soluções foi realizado em células epiteliais HaCat, simulando o contato com os enxaguatórios por 1 min e quantificado pelo método de MTT. Para a análise das propriedades físicas, amostras dos três materiais foram distribuídas em 6 grupos (n=10), de acordo com a solução enxaguatória: GI - Saliva artificial; GII - Periogard sem etanol; GIII - Periogard com etanol; GIV - Listerine Zero; GV - Listerine Tartar Control; GVI - Solução teste à base do CN à 10,9%, sendo submetidas à imersão e agitação por 180 min, simulando bochechos diários por 6 meses. A alteração de superfície das amostras foi avaliada em rugosímetro, no qual um grupo sem imersão foi utilizado como controle (GC); e a alteração de cor, em espectrofotômetro. Como resultados da ação antibiofilme das soluções testadas, observou-se que independente da superfície, todas as soluções impediram o desenvolvimento dos biofilmes de *S. aureus* e *C. albicans*, quando aplicados no início de sua formação (4 h). Para os biofilmes formados (24 h), todas as soluções diferiram dos respectivos controles, em resina ou metal, mostrando atividade contra biofilmes de *S. aureus* e *C. albicans*. CN 5x CBM/CFM e CN 10x CBM/CFM tiveram os melhores efeitos antibiofilme, não diferindo estatisticamente entre si, independente da superfície da amostra. Ambas as concentrações de CN tiveram efeito superior à CHX e LT, independente da superfície. Para os ensaios de citotoxicidade, todas as soluções diluídas em 50 e 25% causaram citotoxicidade celular. A partir da diluição de 3,12%, todas as soluções permitiram mais de 70% de viabilidade celular. Como resultados da alteração de cor foi possível observar que todas as soluções promoveram um ΔE acima de 3,3 para RAAT, valor considerado clinicamente inaceitável. Para os DA não foi notada nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Para a análise de superfície, a rugosidade da RAAT foi alterada somente no grupo GIV - Listerine

Tartar Control, enquanto que não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa para os DA e LNC. Pode-se concluir que ambas as concentrações do enxaguatório à base de citronela tiveram os maiores efeitos antibiofilme, comparativamente às soluções comerciais sem etanol, contra *S. aureus* e *C. albicans*. Todas as soluções enxaguatórias foram citotóxicas nas suas concentrações iniciais, entretanto, após diluição seriada, considerando as concentrações dos princípios ativos dos enxaguatórios comerciais, CN teve o menor efeito citotóxico. A formulação teste à base de 10,9% de CN mostrou-se segura em seu uso como solução enxaguatória, no que se refere às propriedades físicas estudadas.

Palavras-chave: Prótese total; resinas acrílicas; desinfecção; cymbopogon; teste de materiais; propriedades físicas; biofilmes; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*.

*RESUMO GERAL EM
INGLÊS*

CUNHA, B.G. *In vitro* analysis of citronella extract (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthrinses on physical and microbiological properties on materials used in the manufacturing of protocol type prosthesis. 2017. Master's Degree thesis – Dentistry University, São Paulo State University, Araçatuba, 2017.

GENERAL ABSTRACT

The use of mouthrinses is a tool in the control of pathologies related to the use of prostheses. The antimicrobial effectiveness and cytotoxicity of some commercially available mouthrinses are still questioned, making phytotherapy an alternative to be researched. Therefore, this study aimed: 1) to evaluate *in vitro* the efficacy of formulations based on the citronella extract (CN) in monospecific biofilms, in formation and formed, on samples of thermally activated acrylic resin (RAAT) and nickel-chromium (LNC), contaminated by *S. aureus* and *C. albicans*, simulating a protocol prosthesis in buccal medium, compared to two alcohol free commercial mouthrinses (LT - Listerine Zero and CHX - Periogard alcohol free); 2) to evaluate *in vitro* the cytotoxicity of solutions in HaCat epithelial cells, simulating contact with the mouthrinses for 1 min; 3) to evaluate *in vitro* the effect of commercial mouthrinses and the test solution based on the extract of CN at 10.9%, in the alteration of roughness and color of materials used in the manufacturing of protocol type prosthesis; i.e. two tooth marks (DA - Trilux and Vivodent), RAAT and LNC. The color change of the LNC was not evaluated. For the first objective, samples were prepared after obtaining the minimum bactericidal / fungicidal concentration (CBM / CFM) of CN against *S. aureus* and *C. albicans*, RAAT and LNC. The CN's CBM / CFM was multiplied by 5x and 10x for the formulation of two mouthrinses. The surfaces of the samples with the biofilm in formation (4 h of adhesion) and formed (24 h) were subjected to the action of solutions based on CN, Periogard alcohol free (CHX) and Listerine Zero (LT). The simulation of mouthwashing was performed at two different moments; the first simulation after the time of adhesion of 4 h (biofilm in formation) and 24 h

(formed biofilm), and the second simulation, 6 h after the first simulation, for each microorganism. The cytotoxicity assay of the solutions was performed on HaCat epithelial cells, simulating contact with the mouthrinse for 1 min and quantified by the MTT method. For the analysis of the physical properties, samples of three materials were distributed in 6 groups (n = 10) according to the mouthrinse: GI - Artificial saliva; GII - Periogard alcohol free; GIII - Periogard with alcohol; GIV - Listerine Zero; GV- Listerine Tartar Control; GVI - Test solution based on CN at 10.9%, and submitted to immersion and agitation for 180 min, simulating daily mouthwashing for 6 months. The surface change of the samples was evaluated in a rugosimeter and the color change in a spectrophotometer. A group without immersion was used as control (GC). As a result of the antibiofilm action of the tested solutions, it was observed that, regardless of the surface, all solutions prevented the development of the biofilms of *S. aureus* and *C. albicans*, when applied at the beginning of its formation (4 h). For the formed biofilm (24 h), all solutions differed from the respective resin or metal controls, showing activity against biofilms of *S. aureus* and *C. albicans*. CN 5x CBM / CFM and CN 10x CBM / CFM had the best antibiofilm effects, not statistically different from each other, regardless of the sample surface. Both CN concentrations presented a superior effect than CHX and LT, regardless of the surface. For cytotoxicity assays, all solutions diluted at 50 and 25% caused large cell cytotoxicity. From the 3.12% dilution, all solutions allowed more than 70% cell viability. From the results of the color change, it was possible to observe that all solutions promoted a ΔE above 3.3 for RAAT; a value considered clinically unacceptable. For DA, no significant statistical difference was observed in relation to the control group. For the surface analysis, RAAT roughness was altered only in the GIV - Listerine Tartar Control group, whereas there were no significant statistical alterations for the DA and LNC. It can be concluded that both concentrations of citronella-based mouthrinse had the highest antibiofilm effects compared to commercial alcohol free solutions against *S.*

aureus and *C. albicans*. All commercial mouthrinses were cytotoxic at their initial concentrations, however, after serial dilution, considering the concentrations of active principles of commercial mouthrinses, CN had the lowest cytotoxic effect. The test formulation based on 10.9% CN was safe in its use as a mouthrinse solution in respect of the physical properties studied.

Key-words: Denture; acrylic resins; disinfection; cymbopogon; material testing; physical properties; biofilms; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*.

SUMÁRIO

<i>Introdução Geral</i>	27
<i>Capítulo 1</i>	34
<i>Capítulo 2</i>	71
<i>Anexo A</i>	104
<i>Anexo B</i>	112
<i>Anexo C</i>	135
<i>Anexo D</i>	138
<i>Anexo E</i>	141
<i>Anexo F</i>	146

INTRODUÇÃO GERAL

É fato que o uso de próteses dentárias favorece a retenção de biofilme e alimentos. Vários fatores físicos são importantes na colonização microbiana de superfícies sólidas, como a rugosidade da superfície, a hidrofobicidade e a composição química da superfície do material, constituindo-se em regiões preferenciais de colonização de determinados microrganismos.^{1,2} A prótese tipo protocolo é uma modalidade de tratamento desenvolvida para reabilitar pacientes desdentados totais com implantes osseointegrados e uma prótese total fixa aparafusada aos implantes. Esta modalidade de reabilitação não permite que o paciente a retire da cavidade oral para higienização. Portanto, o profissional tem que dar condições para que o mesmo realize sua correta higienização intra-oral e a mantenha livre do acúmulo de biofilme microbiano.

Duas classes de materiais são utilizadas na confecção de uma prótese do tipo protocolo: as ligas metálicas e as resinas acrílicas, na forma de base acrílica da prótese e dentes artificiais. Como infra-estrutura deste tipo de prótese, barras metálicas são confeccionadas em ligas de cobalto-cromo (CoCr), níquel-cromo (NiCr) e titânio (Ti). As ligas de NiCr apresentam custo reduzido e propriedades mecânicas favoráveis, como alta dureza e módulo de elasticidade superior ao das ligas nobres, permitindo assim, fundições mais delgadas e rígidas, com boa resistência à deformação, além de boa resistência à corrosão devido à formação de uma fina camada de óxido de cromo sobre a liga, tornando-a estável quimicamente às trocas iônicas, embora fatores ambientais da cavidade bucal, agindo sobre a superfície dos metais possam contribuir para o aparecimento da corrosão.³ Esses fatores ambientais, agindo em conjunto, podem desencadear alterações na superfície dessas ligas, com o surgimento de corrosão e rugosidade superficial.⁴

Esta barra metálica é revestida posteriormente por uma base acrílica (polimetilmetacrilato, PMMA), normalmente uma resina acrílica ativada termicamente (RAAT) e pelos dentes artificiais. Dentre as propriedades requeridas nestes materiais, aquelas

relacionadas com a superfície, como a rugosidade, são de grande importância clínica, já que facilitam o acúmulo de biofilme e manchamento.¹ A redução da rugosidade de superfície resulta em um retardamento da formação e maturação do biofilme. Embora a rugosidade e energia de superfície atuem conjuntamente, a influência da rugosidade é dominante.⁵ A importância de ambos os parâmetros justifica a necessidade de superfícies lisas.⁵⁻⁷

É preconizado valores de rugosidade próximos ou inferiores a 0,2 μm , para dificultar a adesão microbiana. Uma superfície lisa é mais resistente à contaminação por microrganismos.^{8,9} Um dos principais requisitos para que uma prótese total seja considerada satisfatória é que a superfície que fica em contato com a mucosa jugal esteja bastante lisa. Assim, o polimento da base da prótese (PMMA) e a manutenção de sua lisura, contribuem para o conforto do paciente, estética agradável e também para que seja minimizada a retenção de microrganismos na superfície da mesma. Dessa forma, qualquer procedimento que altere a rugosidade de superfície do material irá influenciar diretamente na adesão de microrganismos, uma vez que a presença de irregularidades funciona como abrigo microbiano, aumentando a probabilidade destes microrganismos permanecerem nas superfícies, mesmo depois dos procedimentos convencionais de limpeza.^{1,7,10}

A estética também é um fator muito importante a ser considerado na reabilitação oral, seja por meio de próteses totais, parciais removíveis e sobre implantes.¹¹ A estabilidade da cor dos dentes artificiais e da base protética é um dos objetivos almejados pelo cirurgião-dentista, tornando-se imprescindível que ela se mantenha ao longo do tempo para se conseguir sucesso e longevidade da reabilitação oral.¹² Dessa forma, os enxaguatórios bucais não deveriam acarretar alterações nesta propriedade física dos materiais relacionados com a prótese.

A manutenção das próteses implanto-suportadas está diretamente relacionada à longevidade do tratamento proposto, e desta forma, entende-se que a higiene oral e/ou acompanhamento insuficientes podem levar à formação de biofilme em componentes

protéticos, o qual dará início a uma resposta imune inflamatória, podendo ocasionar desde uma mucosite peri-implantar até uma peri-implantite, com conseqüente perda do suporte ósseo peri-implantar e uma estomatite protética.^{13,14} Deste modo, a manutenção do tratamento relaciona-se diretamente aos cuidados do dentista e do próprio paciente.¹⁵ Estudos mostram que outras patologias podem estar associadas ao biofilme da prótese, como por exemplo, infecções gastrointestinais e pulmonares, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou idosos, pela deglutição e aspiração contínua de microrganismos do biofilme da prótese.^{16,17}

Dentre os microrganismos presentes na microbiota oral, os do gênero *Candida* estão normalmente presentes, e geralmente não causam doença. Porém, sob certas circunstâncias, estes podem agir como agentes infecciosos, causando o aparecimento de candidíase, inclusive em pacientes submetidos à quimioterapia.¹⁸⁻²⁰ Também foi relatado que a *C. albicans* é responsável por 70% dos casos de estomatites protéticas.²¹⁻²³ Alguns estudos também detectaram a presença de *Candida* spp. em sítios de peri-implantites.^{24,25}

Outra espécie de microrganismo relacionada com infecções protéticas é a do *Staphylococcus*. O *Staphylococcus aureus* vive principalmente nas superfícies das mucosas e tem sido considerado um dos mais versáteis e perigosos patógenos humanos, tendo habilidade para se aderir em superfícies de polímeros.²⁶⁻²⁸ Uma série de estudos clínicos identificaram níveis elevados de *S. aureus* dentro de bolsas peri-implantares supurativas e com sangramento, exibindo uma específica afinidade por superfícies de titânio.²⁹⁻³³

O controle de formação de biofilme é muito importante para manter a saúde geral e da cavidade oral dos portadores de próteses. Isto deve ser promovido por meio de técnicas diárias de higienização, realizadas pelo próprio paciente. Essa rotina de higiene deve ser realizada por meio de técnicas de limpeza mecânica, e por meio de enxaguatórios bucais, visto que a prótese do tipo protocolo não pode ser removida da boca pelo paciente, para realização de desinfecção com produtos químicos. Dessa forma, soluções de bochecho devem ser utilizadas,

dentre elas, a solução de clorexidina a 0,12% (com e sem etanol).³⁴⁻³⁵ Entretanto, o uso da clorexidina tem que ser indicado com cautela, visto que existem efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento de dentes artificiais e os materiais da base da prótese, alteração do paladar, citotoxicidade, além de descamação da mucosa oral e reações anafiláticas em casos mais severos de hipersensibilidade.³⁶⁻⁴²

Outra opção comercialmente disponível para esta finalidade é o Listerine, que pode ser encontrado também em duas formulações, sem etanol (Listerine Zero) e com etanol. A primeira é uma solução enxaguatória composta por óleos essenciais como timol, eucaliptol, mentol, salicilato de metila, e a segunda contém cloreto de zinco (além dos óleos essenciais da versão sem etanol), com boa eficácia antimicrobiana e redução da formação de cálculo.⁴³⁻⁴⁵ Estudos sobre sua influência na alteração de superfície e cor dos materiais usados na confecção de prótese necessitam ser realizados. No que diz respeito ao produto sem etanol, existem poucos estudos na comprovando sua eficácia antimicrobiana e nenhum estudo mostrando seus efeitos sobre as propriedades dos materiais.^{46,47}

Dessa forma, a busca de métodos alternativos de desinfecção, com soluções que não alterem as propriedades do material e que sejam inertes para o seu portador torna-se essencial. A fitoterapia, sendo de baixo custo e fácil utilização, destaca-se como alternativa a ser pesquisada, dada a escassez de estudos em Odontologia. A planta conhecida como citronela (*Cymbopogon nardus*) é utilizada para a extração de óleo essencial, muito utilizado como repelente de insetos, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, geraniol e o citronelol, que são antissépticos, daí seu extenso uso em sabões e desinfetantes domésticos.^{48,49} Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa eficácia antimicrobiana e bons resultados de citotoxicidade em certas concentrações.^{48,50,51} Como por exemplo, seu uso como agente desinfetante de próteses buco-maxilo-faciais.^{52,53} Nesse sentido, a citronela é considerada como uma planta de ação

antibacteriana e antifúngica potencial, abrindo novas perspectivas de controle de infecção humana. Com base nestas informações, percebe-se a necessidade da realização de estudos que investiguem a sua ação antibiofilme e sua ação na alteração das propriedades dos materiais utilizados na confecção de próteses.

A primeira hipótese testada foi a de que a solução teste à base de citronela teria uma eficácia semelhante às soluções enxaguatórias comerciais sobre os biofilmes. E que seu efeito citotóxico seria menor ou igual em relação aos produtos comerciais. A segunda hipótese foi a de que a solução enxaguatória à base de citronela não promoveria danos às propriedades físicas dos materiais testados.

*Referências em ANEXO A

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que as soluções enxaguatórias promoveram alteração de cor nos materiais odontológicos testados, após 6 meses de simulação de bochechos. Entretanto, nenhuma das soluções enxaguatórias promoveram alteração de rugosidade nos materiais testados, acima dos valores considerados críticos. A formulação teste à base de 10,9% de CN mostra-se segura em seu uso como solução enxaguatória, no que se refere às propriedades físicas estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997;13:258-69.
2. Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone. *Int J Biomater* 2009;2009:718017.
3. Kelly JR, Rose TC. Nonprecious alloys for use in fixed prosthodontics: a literature review. *J Prosthet Dent* 1983;49:363-69.
4. Guilherme AS, Henriques GEP, Zavanelli, RA, Mesquita, MF. Surface roughness and fatigue performance of commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy after different polishing protocols. *J Prosthet Dent* 2005;93:378-85.
5. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of literature. *J Clin Periodontol* 1995;22:1-14.
6. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997;77:535-9.
7. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont* 2000;13:136-40.
8. Perez Davidi M, Beyth N, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI. Effect of liquid-polish coating on in vivo biofilm accumulation on provisional restorations: part 1. *Quintessence Int* 2007;38:591-6.
9. Atabek D, Sillelioglu H, Olmez A. The efficiency of a new polishing material: nanotechnology liquid polish. *Oper Dent* 2010;35:362-9.

10. Al-Rifaiy MQ. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. *Saudi Dent J* 2010;22:13-7.
11. Hassel AJ, Wegener I, Rolko C, Nitschke I. Self-rating of satisfaction with dental appearance in an elderly German population. *Int Dent J* 2008;58:98-102.
12. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillips' science of dental materials*. 12th ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2013.
13. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent Bristol* 1998;26:299-304.
14. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Impl Res* 2000;11:146–155.
15. Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. *Nurs Times* 2003;99:52-3.
16. Pedrazzi V, Escobar EC, Cortelli JR, Haas AN, Andrade AK, Pannuti CM, et al. Antimicrobial mouthrinse use as an adjunct method in peri-implant biofilm control. *Braz Oral Res* 2014;28:1-9.
17. Kracher CM, Smith WS. Oral health maintenance dental implants. *Dent Assist* 2010;79:27-35.
18. Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 2006;137:16S-21S.
19. Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res* 2009;23:39-48.
20. Verardi G, Cenci MS, Maske TT, Webber B, Santos LR. Antiseptics and microcosm biofilm formation on titanium surfaces. *Braz Oral Res* 2016;30:1-6.

21. da Costa LF, Amaral CD, Barbirato DD, Leão AT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2017;1-11.
22. Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2010;37:829–839.
23. Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
24. Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav* 2001;74:85-99.
25. Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 2002;27:73-80.
26. Paranhos RMZF, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SCH, Ito IY, De Mattos MGC. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci* 2007;15:33-8.
27. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et.al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2012;29:838-44.
28. 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;30:32-9.

29. Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med* 2016; 37:1594-600.
30. Charles CH, Cronin MJ, Conforti NJ, Dembling WZ, Petrone DM, McGuire JA. Anticalculus efficacy of an antiseptic mouthrinse containing zinc chloride. *J Am Dent Assoc* 2001;132:94-8.
31. Fine DH, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD. *In vivo* antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use. *J Clin Periodontol* 2005;32:335-40.
32. Chen Y, Wong RW, Seneviratne CJ, Hägg U, McGrath C, Samaranayake LP. Comparison of the antimicrobial activity of Listerine and Corsodyl on orthodontic brackets *in vitro*. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;140:537-42.
33. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial. *Am J Dent* 2013;26:149-55.
34. Vlachoianis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine® Products: An Update on the Efficacy and Safety. *Phytother Res* 2016;30:367-73.
35. Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *JARQ* 2003;37:249-252.

36. Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L. *In vitro* cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 2009;4:29-34.
37. Ahmad A, Viljoen A. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 2015;22:657-65.
38. Guiotti AM, Goiato MC, Dos Santos DM, Vechiato-Filho AJ, Cunha BG, Paulini MB, et.al. Comparison of conventional and plant-extract disinfectant solutions on the hardness and color stability of a maxillofacial elastomer after artificial aging. *J Prosthet Dent* 2016;115:501-8.
39. Guiotti AM, Cunha BG, Paulini MB, Goiato MC, Dos Santos DM, Duque C, et.al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *J Prosthet Dent* 2016;116:136-43.
40. Arruda CNF, Sorgini DB, Oliveira VC, Macedo AP, Lovato CHS, Paranhos HFO. Effects of denture cleansers on heat-polymerized acrylic resin: a five-year-simulated period of use. *Braz Dental J* 2015;26:404-8.
41. CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). Colorimetry - technical report. CIE Pub. No. 15. Vienna: Bureau Central de la CIE; 1996
42. Miyagawa Y, Powers JM, O'Brien WJ. Optical properties of direct restorative materials. *J Dent Res* 1981;60:890-4.
43. Brook AH, Smith RN, Lath DJ. The clinical measurement of tooth color and stain. *Int Dent J* 2007;57:324-30.

44. Sarkis E. Color change of some aesthetic dental materials: Effect of immersion solutions and finishing of their surfaces. *Saudi Dent J* 2012;24:85–9.
45. Davi LR, Felipucci DNB, de Souza RF, Bezzon OL, Lovato-Silva CH, Pagnano VO, et al. Effect of denture cleansers on metal ion release and surface roughness of denture base materials. *Braz Dent J* 2012;23:387-93.
46. Paranhos HFO, Peracini A, Pisani MX, Oliveira VC, de Souza RF, Silva-Lovato CH. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. *Braz Dent J* 2013;24:152-6.
47. Wiltshire WA, Labuschagne PW. Staining of light-cured aesthetic resin restorative materials by different staining media: an *in vitro* study. *J Dent Assoc S Afr* 1990;45:561-5.
48. Asmussen E. Factors Affecting the Color Stability of Restorative Resins. *Acta Odontol Scand* 1983;41:11-18.
49. Peutzfeldt A, Asmussen E. Color stability of three composite resins used in the inlay/onlay technique. *Scand J Dent Res* 1990; 98:257-60.
50. Uchida H, Vaidyanathan J, Viswanadhan T, Vaidyanathan TK. Color stability of dental composites as a function of shade. *J Prosthet Dent* 1998;79:372-7.
51. Iazzetti G, Burgess JO, Gardiner D, Ripps A. Color stability of fluoride-containing restorative materials. *Oper Dent* 2000;25:520-5.
52. Bagheri R, Burrow MF, Tyas M. Influence of food-simulating solutions and surface finish on susceptibility to staining of aesthetic restorative materials. *J Dent* 2005;33:389-398.
53. Goiato MC, Nóbrega AS, dos Santos DM, Andreotti AM, Moreno A. Effect of different solutions on color stability of acrylic resin-based dentures. *Braz Oral Res* 2014;28:1-7.

54. Compagnoni MA, Barbosa DB, de Souza RF, Pero AC. The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. *J Prosthet Dent* 2004;91:281-5.
55. May KB, Shotwell JR, Koran A 3rd, Wang RF. May Color stability: denture base resins processed with the microwave method. *J Prosthet Dent* 1996;76:581-9.
56. Machado C, Rizzatti-Barbosa CM, Gabriotti MN, Joia FA, Ribeiro MC, Sousa RL. Influence of mechanical and chemical polishing in the solubility of acrylic resins polymerized by microwave irradiation and conventional water bath. *Dent Mater* 2004;20:565-9.
57. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont* 2007;16:465-72.
58. Fuhrer N. Restoring posterior teeth with a novel indirect composite resin system. *J Esthet Dent* 1997;9:124-30.
59. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and longterm water immersion. *J Prosthet Dent* 2005;93:171-6.
60. Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kümmerer K. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater* 2007;23:1535-41.