



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA CAMPUS ARAÇATUBA  
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS E PRÓTESE

**LETÍCIA DE OLIVEIRA GONÇALVES**

**Análise "in vitro" da citotoxicidade de soluções utilizadas  
na desinfecção de próteses oculares em células da  
conjuntiva ocular.**

Araçatuba - SP  
2017

**LETÍCIA DE OLIVEIRA GONÇALVES**

**Análise “in vitro” da citotoxicidade de soluções utilizadas na desinfecção de próteses oculares em células da conjuntiva ocular.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Daniela Micheline dos Santos

Araçatuba – SP  
2017

*Dedico aos meus pais, José Carlos Gonçalves e Marilene Aparecida de Oliveira Gonçalves. Responsáveis por todo meu aprendizado e conquistas. Por não medirem esforços para me proporcionar a melhor educação, por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia, a não desistir dos meus sonhos e a alcançá-los sempre com humildade e amor.*

*A minha irmã mais velha, Larissa de Oliveira Gonçalves, por estar sempre presente, sempre cuidando para que eu esteja bem. Meu espelho, exemplo e inspiração*

*A minha irmã gêmea, Luanna de Oliveira Gonçalves, por ser uma parte de mim, minha outra metade. O presente que Deus me deu o dia que eu nasci para que eu nunca fique sozinha, minha melhor amiga, minha eterna dupla nas clínicas, minha companheira de vida.*

## *AGRADECIMENTOS*

*Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida. Por sempre me dar força, sabedoria e coragem para seguir em frente, por iluminar meu caminho, minhas decisões e por sempre colocar pessoas maravilhosas ao meu lado.*

*À minha família, meus pais e minhas irmãs. Por sempre me apoiarem e estarem do meu lado. Sem vocês e nada seria. Obrigada por serem os responsáveis por eu ter chegado até aqui, por enfrentarmos todas as dificuldades juntos. Não há palavras que expressem o tamanho da minha gratidão.*

*Ao padrinho Alonso, por ser o meu segundo pai, uma pessoa iluminada que chegou nas nossas vidas para torná-la mais especial. Obrigada por todo cuidado, carinho e amor por mim e pelas minhas irmãs.*

*À professora Daniela, agradeço por todo aprendizado, orientação, apoio e confiança durante esses anos. Agradeço a oportunidade de ter ingressado em uma equipe de pesquisa, por toda dedicação e carinho. Deixo aqui registrado, professora, minha imensa admiração e carinho por você e pelo seu trabalho. Obrigada por tudo.*

*À Agda, agradeço por toda ajuda ao conduzir esse projeto, obrigada pela paciência e ensinamentos. Sem você eu não conseguiria.*

*Aos ritmistas da Surubateria. Obrigada por serem a minha segunda família. Por tornarem os meus dias em Araçatuba mais alegres. Obrigada pelo companheirismo e por tornarem qualquer evento chato em um dia memorável. Por fazerem de algo simples, a melhor risada. Sem vocês esses anos não seriam tão completos.*

*Minha gratidão especial aos meus amigos Luís Felipe Pupim, Juliana Morabito, Rafaela Laruzo, Laís Kawamata, Fernanda*

*Zabatiero, Thainan Vescio, Nairobi Augusto, Felipe Pacola, Carolina Rodrigues, Mariana Viana, Lara Suttini, Pedro Henrique Chaves e Willian Jacometo por todo carinho companheirismo e amizade que guardarei para sempre.*

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela formação acadêmica e todas as oportunidades de aprendizagem.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa.*

*À todos que de certa forma contribuíram para elaboração e conclusão desse trabalho.*

GONÇALVES, L. O. **Análise “in vitro” da citotoxicidade de soluções utilizadas na desinfecção de próteses oculares em células da conjuntiva ocular.** 2017. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2017.

## **RESUMO**

O controle de formação de biofilme pode ser realizado por meio de técnicas de limpeza e desinfecção diárias, com diferentes soluções encontradas no mercado. Embora o efeito citotóxico dessas soluções tenha sido testado em diferentes células, não há relato sobre seu efeito nas células da cavidade anoftálmica. Assim, esse estudo objetiva avaliar o potencial citotóxico de diferentes soluções desinfetantes nas células da conjuntiva ocular humana. Para isso, amostras de resina acrílica na cor N1 (branca) para esclera artificial, foram confeccionadas e distribuídas em 6 grupos de acordo com a solução utilizada: I – Sem desinfecção (imersas em soro fisiológico); II – Sabão neutro; III – Clorexidina 4%; IV – Efferdent; V – Triclosan 1% e VI – Óleo Essencial de Citronela. As amostras foram desinfetadas diariamente, por diferentes períodos: 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, de acordo com o protocolo de desinfecção de cada solução. Após cada período, foi realizado o teste de citotoxicidade das amostras de resina acrílica, por meio da análise com MTT, após 24 horas de contato das células com o extrato liberado pelas amostras desinfetadas. Os resultados demonstraram não haver citotoxicidade das soluções desinfetantes avaliadas, sendo que todos os grupos apresentaram valor de proliferação celular acima de 84% após submetidos aos estímulos. Sendo assim conclui-se que os métodos e soluções de desinfecção utilizados para limpeza de prótese ocular não apresentam atividade citotóxica em relação às células da conjuntiva ocular humana.

**Palavras-chave:** citotoxicidade; desinfecção; prótese ocular

GONÇALVES, L. O. **In vitro analysis of the cytotoxicity of solutions used in the disinfection of ocular prostheses in ocular conjunctiva cells.** 2017 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2017.

## **ABSTRACT**

Biofilm formation control can be accomplished by daily cleaning and disinfection techniques, with different solutions found in the market. Although the cytotoxic effect of these solutions has been tested in several cells, there is no report about its influence on cells of anophthalmic cavity. Thus, this study aimed to evaluate the cytotoxic potential of different disinfectant solutions in ocular human conjunctiva cells. For this, white N1 acrylic resin samples for artificial sclera were prepared and distributed into 6 groups according to solution used: I - No disinfection (immersed in saline); II - Mild soap; III - 4% chlorhexidine; IV - Efferdent; V - 1% Triclosan and VI - Citronella Essential Oil. Samples were disinfected daily for different periods: 1, 7, 15, 30, 60 and 90 days, according to the protocol of each disinfecting solution. After each period, cytotoxicity was performed through MTT analysis 24 hours after cells were kept in contact with the extract released by samples disinfected. The results showed no cytotoxicity of disinfectant solutions evaluated, and all groups presented cell proliferation value above 84% after subjected to stimuli. Therefore it is concluded that the methods and disinfecting solutions used for cleaning the ocular prosthesis do not exhibit cytotoxic activity in contact with human conjunctiva cells.

**Keywords:** cytotoxicity; disinfection; prostheses in ocular

## LISTA DE ABREVIATURAS

CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

MTT = (3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio)



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de proliferação celular para os diferentes métodos de polimerização avaliados.	24
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios  $\pm$  desvio padrão do percentual de proliferação celular (MTT) para os diferentes agentes desinfetantes analisados.

23

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 : Procedimentos de desinfecção realizados nas amostras de resina acrílica, diariamente.

20

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	OBJETIVOS .....	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1.	Confecção das Amostras .....	18
3.2.	Desinfecção das Amostras .....	20
3.3.	Obtenção dos Extratos .....	20
3.4.	Cultura e Manutenção das Células .....	21
3.5.	Quantificação das Células e Teste de Citotoxicidade .....	21
3.6.	Análise Estatística .....	22
4	RESULTADOS .....	23
5	DISCUSSÃO .....	25
6	CONCLUSÃO .....	29
7	REFERÊNCIAS .....	30

## 1 INTRODUÇÃO

A prótese ocular é considerada um importante tratamento para pacientes que foram submetidos à perda total ou parcial do globo ocular devido a trauma, neoplasias ou deformações congênitas<sup>1,2</sup>. Embora a prótese ocular encontre-se adequadamente adaptada na cavidade anoftálmica, em um grande número de casos pode-se observar certo grau de “espaço morto”, entre a superfície posterior da mesma e o fundo da cavidade. A secreção lacrimal, muco e resíduos estagnados nesse espaço constituem excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano<sup>3</sup>. Por esse motivo, o controle de formação de biofilme é muito importante para manter a saúde da cavidade anoftálmica dos portadores de prótese ocular e pode ser realizado por meio de técnicas de limpeza e desinfecção diárias, entre elas o uso de sabão neutro<sup>4-6</sup>, encontrado facilmente no mercado.

Dentre as soluções potencialmente antimicrobianas que têm sido aplicadas na desinfecção de próteses oculares, destaca-se a clorexidina, um agente antimicrobiano de amplo espectro que tem sido muito utilizado na pele, mucosa e cavidade oral como desinfetante devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, impedindo a proliferação de microorganismos<sup>4,5,7</sup>. Apesar amplamente utilizado, estudos relatam que a clorexidina pode exibir efeitos citotóxicos e genotóxicos para os tecidos<sup>8-11</sup> mesmo nas concentrações clínicas recomendadas<sup>12,13</sup>. Efeitos citotóxicos da clorexidina foram encontrados em células do osso alveolar e epitélio gengival<sup>14</sup>, enquanto efeitos colaterais genotóxicos foram encontrados em células sanguíneas e epiteliais quando usados, por exemplo, em bochechos orais<sup>15</sup>. Em aplicações tópicas, foi relatada a penetração da clorexidina através da barreira epitelial, causando danos nos tecidos. Apesar desses efeitos citotóxicos, a clorexidina ainda é recomendada em um grande número de casos na odontologia, como nas doenças periodontais, e até mesmo para uso individual<sup>16</sup>, como por exemplo, na desinfecção das próteses oculares.

O uso de pastilhas efervescentes, como as utilizadas para desinfecção de prótese total<sup>4,5,17</sup>, também têm sido relatado, demonstrando resultados satisfatórios. As pastilhas efervescentes são bem conhecidas como agentes de limpeza de próteses totais. A imersão das próteses nesse peróxido alcalino é um método simples de higienização<sup>18</sup>. De acordo com a bula do fabricante, o Efferdent contém

em sua composição alguns compostos que quando em contato com a pele, trato respiratório, trato gastrointestinal e olhos, podem causar reações como queimaduras. Le Coz et al. (1999)<sup>19</sup> relatam que, o principal composto da pastilha causador de reações é o perborato de potássio. Entretanto, o fabricante relata que não há resquícios de persulfato na prótese caso o paciente utilize as pastilhas da forma recomendada, ou seja, enxaguando abundantemente a prótese após o uso. Porém, no caso das próteses confeccionadas em resina acrílica (dentaduras, PPRs, próteses oculares, entre outras), o material pode se tornar progressivamente poroso e provavelmente absorver muitas substâncias. Assim, os agentes contidos nas pastilhas são progressivamente liberados podendo provocar reações como queilites, dermatites, estomatites, entre outras. Além disso, não temos controle se o paciente utiliza adequadamente o produto. Os persulfatos são agentes oxidantes amplamente utilizados em muitos processos. Eles apresentam atividade histamínica e um fraco potencial de sensibilização, o que pode levar a dermatites de contato, urticárias, dermatites alérgicas, rinites, asma ou até mesmo a síncope<sup>19,20</sup>.

Ainda, sabonetes antissépticos podem ser usados na limpeza e desinfecção das próteses oculares, uma vez que a maioria deles apresenta em sua composição o triclosan, um importante agente antimicrobiano<sup>21</sup>. A efetividade antimicrobiana do triclosan tem sido testada em diferentes formulações comerciais contendo esse agente nas concentrações de 0,2 a 2%, embora estudos aleguem que as formulações contendo 1% de triclosan são apropriadas e ideais para o efeito antimicrobiano desejado<sup>22</sup>. Entretanto, estudos relatam que o uso excessivo de triclosan pode alterar a flora microbiana comensal, levando a um comprometimento da maturação normal do sistema imune<sup>23-25</sup>. Reações alérgicas ao uso de triclosan têm sido relatadas<sup>26</sup>. Recentemente, um estudo relatou que o triclosan aumenta as respostas alérgicas em ratos com asma<sup>27</sup> e que os níveis urinários de triclosan em crianças e adolescentes foram positivamente associados com a sensibilização alérgica<sup>28</sup>. Além disso, casos de urticária devido ao uso de triclosan também foram relatados<sup>29</sup>.

Uma alternativa inovadora a ser pesquisada, são os fitoterápicos, sendo de baixo custo e fácil utilização, como por exemplo, a citronela, considerada uma erva de ação antibacteriana e antifúngica potencial<sup>30</sup>. As espécies de *Cymbopogon*, nas quais se inclui a citronela, são comumente usadas na medicina para tratamento de muitas doenças. Os óleos essenciais dessas espécies são conhecidos pela sua

atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, analgésica, antinociceptiva, neurológicas e inseticidas<sup>31-35</sup>. De acordo com Sfeir et al. (2013)<sup>36</sup>, estudos sobre a citotoxicidade dos óleos essenciais devem ser realizados, uma vez que poucos estudos clínicos abordam a toxicidade e farmacocinética dessas substâncias. Estudos alertam para a possível toxicidade de alguns óleos essenciais, em especial os que contêm fenóis e aldeídos, como no caso da citronela, devendo inclusive evitar sua inalação<sup>37</sup>. Ainda, no estudo de Kpoviessi et al (2014)<sup>38</sup>, a citotoxicidade da citronela foi avaliada em células de ovário de hamsters e em uma linhagem de fibroblastos humanos e observaram que o fitoterápico foi tóxico para as células de ovário e moderadamente tóxico para os fibroblastos.

Embora a desinfecção da prótese seja imprescindível, o paciente, após o uso do desinfetante, pode não enxaguar corretamente a prótese antes de colocá-la de volta na cavidade anoftálmica. Ainda, a resina acrílica é um material que pode se tornar rugoso ou poroso ao longo tempo, podendo acumular substâncias em sua superfície. Essas substâncias podem vir a ser liberadas para a cavidade anoftálmica, possivelmente causando algum dano à mucosa da cavidade<sup>19</sup>. A maioria dos produtos químicos em contato direto com a pele ou mucosa podem ser potencialmente irritantes. Esse fator irritante não está somente relacionado à sua natureza química, mas também a muitos outros fatores como: concentração, veículo, temperatura, alterações no tecido (trauma mecânico, ulcerações, eczemas). Essas considerações são diretamente aplicadas aos agentes antissépticos, que geralmente apresentam propriedades irritantes aos tecidos<sup>26</sup>.

Embora o potencial tóxico dessas substâncias já tenha sido testado em muitos tipos de células<sup>12,19,26,38</sup>, não há dados na literatura a respeito de sua toxicidade nas células da conjuntiva ocular humana, sendo este um dos únicos tecidos que permanece após a ressecção cirúrgica do globo ocular.

A conjuntiva é uma membrana mucosa transparente, fina e resistente, que cobre a parte posterior da pálpebra e se estende para trás. Além de ricamente vascularizada, a conjuntiva protege a cavidade de corpos estranhos e infecções<sup>39</sup>. A linhagem de células Chang, da conjuntiva humana, tem sido amplamente utilizada em estudos *in vitro* que analisam potenciais efeitos, dentre eles a citotoxicidade de substâncias sobre a conjuntiva<sup>40</sup>. Testes *in vitro* da citotoxicidade são importantes para garantir segurança e biocompatibilidade na utilização de substâncias em seres humanos. O método de cultura de células, por exemplo, é um teste relativamente

simples de ser executado, é reprodutível, pode ser cuidadosamente controlado e possui adequado custo-benefício <sup>41,42</sup>.

Com base nas afirmações acima, esse estudo justifica-se pela importância de avaliar a biocompatibilidade das soluções desinfetantes utilizadas na higienização de próteses oculares previamente à sua indicação, uma vez que muitos estudos demonstraram efeitos adversos dessas substâncias em vários tipos de células, mas não nas células da conjuntiva humana.



## **2 OBJETIVOS**

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a citotoxicidade dos desinfetantes acima citados sobre células da conjuntiva ocular humana.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Confeção das Amostras

Inicialmente, foram confeccionadas amostras de resina acrílica branca, cor N1, específica para confecção da esclera artificial (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). As amostras foram divididas em 6 grupos (n=3), de acordo com a solução desinfetante utilizada: G1: Sem Desinfecção (imersas em soro fisiológico), G2: Sabão Neutro, G3: Clorexidina 4%, G4: Efferdent, G5: Triclosan 1% e G6: Óleo Essencial de Citronela. Para a padronização das amostras, foi utilizada uma matriz metálica vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada. Esta matriz foi fixada sobre uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. E Com. Ltda., Cotia, São Paulo, Brasil).

Em seguida o conjunto lâmina de vidro + matriz metálica foi incluído em gesso, em mufla própria para polimerização em forno microondas (VIPI STG, VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, São Paulo, Brasil). Para isso, a superfície interna da base da mufla foi isolada com vaselina em pasta, preenchida com gesso especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind e Com Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) vertido sob vibração constante.

Após a cristalização do gesso, outra lâmina de vidro com as mesmas dimensões citadas foi posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone de condensação. A contra-mufla foi posicionada e, sobre a superfície desta última lâmina de vidro, foi vertido gesso especial tipo IV. A mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH, Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) sob pressão constante de 1200 Kg/F por 2 minutos. Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a cera removida do interior de cada superfície interna da matriz. A superfície do vidro foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil).

A resina acrílica termopolimerizável N1 para esclera artificial foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada mufla, 2,1 g de polímero (pó) foram manipulados com 0,7 mL de monômero (líquido) e, ao atingir a fase plástica, inserido no interior das superfícies internas da matriz incluída em mufla. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada à prensa hidráulica,

com força de 1200Kg/F, durante 2 minutos. Foi realizada a polimerização de bancada por 30 minutos, e então, a polimerização por energia de microondas (Brastemp, São Paulo, Brazil) com 1200 W de potência durante 10 minutos. Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta, resfriada em temperatura ambiente, e então, as amostras de resina acrílica foram removidas.

As superfícies das amostras foram submetidas ao polimento em politriz universal semiautomática (Arotec S.A. Ind Com, Cotia, São Paulo, Brasil), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600 e 800 e 1200) (Buehler, Illinois, EUA), sendo posteriormente finalizadas com solução diamantada em disco de feltro. As amostras foram mensuradas com paquímetro digital (500-171-20B; Mitutoyo, Tóquio, Japão) para garantir as dimensões propostas. As amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Arotec, Odontobrás, São Paulo, SP) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina, e então mantidas em água destilada em uma estufa bacteriológica digital (CIENLAB, Campinas, Brasil) a 37°C por 24 horas, para facilitar a hidratação e liberação de monômero residual <sup>(34)</sup>.

Realizou-se a desinfecção das amostras com 5 diferentes soluções e 1 grupo não será desinfetado, de acordo com o Quadro 1, por períodos de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Para cada período de desinfecção, foram confeccionadas 54 amostras, sendo 3 para cada grupo de desinfetante e para cada período. As amostras não foram reaproveitadas, pois depois de submetidas às análises de citotoxicidade foram descartadas.

### 3.2 Desinfecção das Amostras

**Quadro 1:** Procedimentos de desinfecção realizados nas amostras de resina acrílica, diariamente.

Desinfetante	Desinfecção	Fabricante
Sem desinfecção	Não desinfetada. Armazenada em soro fisiológico	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.
Sabão Neutro	Fricção digital por 30 segundos (s), utilizando luva estéril; enxágue com água destilada estéril por 30s (4, 6, 35)	Johnson & Johnson, São Jose dos Campos, São Paulo, Brasil.
Clorexidina 4%	Imersão por 10 min. (4, 5, 8, 36). Enxague em água destilada estéril por 30s	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.
Efferdent Original Denture Cleanser	Imersão em água destilada estéril contendo uma pastilha efervescente, à temperatura de 37° C por 15 min. Enxágue em água destilada estéril por 30 segundos (5, 8)	Pfizer Consumer Health, Morris Plains, Nova Jersey, EUA
Triclosan 1%	Imersão por 10 min. Enxágue em água destilada estéril por 30 segundos.	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.
Óleo Essencial de Citronela	Imersão por 10 min. Enxágue em água destilada estéril por 30 segundos.	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.

### 3.3 Obtenção dos Extratos

Os extratos das substâncias hidrossolúveis presentes nas amostras previamente desinfetadas foram utilizados para a análise do seu efeito citotóxico <sup>(32, 37)</sup>. Para isso, após cada período de desinfecção com as soluções propostas e seguindo os protocolos acima recomendados, cada grupo de amostras desinfetadas (n=3) foi colocado em um tubo falcon contendo 6mL de meio de cultura 199, suplementado com uma concentração 5% de soro fetal bovino, previamente determinada por um estudo piloto. E incubado em estufa à 37°C pelo período de 24 horas. No curso desse período de incubação pode haver a difusão das substâncias para o meio de cultura, com a conseqüente formação dos extratos que foram utilizados no teste de citotoxicidade. Posteriormente, filtros Millex (Millipore) de 0,22 µm para esterilização foram utilizados para filtrar os extratos, tendo em vista a grande facilidade de contaminação do meio devido a sua riqueza em nutrientes.

### 3.4 Cultura e Manutenção das Células

Células Chang, da conjuntiva humana, foram expandidas em meio de cultura 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5 ml de penicilina, 300  $\mu$ L de fungizone e 500  $\mu$ L de gentamicina. Essas células foram cultivadas em garrafas para culturas de células com tampa, que permitem a passagem de CO<sub>2</sub> por meio de um filtro. Por sua vez, as garrafas foram incubadas com 5% de CO<sub>2</sub>, em ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C<sup>(38, 39)</sup>. Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novas garrafas até atingirem confluência para a realização dos ensaios. Após esse período, utilizou-se tripsina a 0,025%, incubada a 37°C por 2-5 minutos, com o objetivo de descolar e desagregar as células das garrafas e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1mL foi depositado em nova garrafa, sendo acrescentados 9 mL de meio de cultura suplementado. As garrafas foram então tampadas e levadas à estufa para a formação de nova confluência de células. Previamente aos procedimentos, todos os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados em luz ultravioleta, por 20 minutos, dentro da capela de fluxo laminar. Além disso, os procedimentos foram executados em área asséptica, dentro da capela de fluxo laminar já desinfetada com álcool 70 e luz ultra-violeta<sup>(37, 40)</sup>.

### 3.5 Quantificação das Células e Teste de Citotoxicidade

Para a realização dos testes de citotoxicidade foram preparadas suspensões celulares de 1x10<sup>5</sup> células/mL da linhagem Chang, concentração previamente definida por um estudo piloto. Para isso, as células foram desgrudadas do fundo das garrafas. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 mL que foi levado à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, para permitir a precipitação das células no fundo do tubo. Em seguida, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1mL de meio de cultura 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino, foi acrescentado e, por fim, as células foram misturadas a ele. A partir daí, 13  $\mu$ L foram retirados e colocados em câmara hemocitométrica tipo Neubauer. Então, com a utilização de um microscópio óptico, com aumento de 40 vezes, as células viáveis foram contadas. As suspensões celulares foram, posteriormente, ajustadas às concentrações de 1x10<sup>5</sup> células/mL para a linhagem Chang<sup>(39, 41, 42)</sup>, sendo 1mL pipetado em cada poço, de uma placa

de 24 poços. Após o período de 24 horas, foi realizado o descarte do meio de cultura e 500 µL de cada extrato previamente obtido, com concentração de soro fetal bovino de 5%, foi adicionado em cada um dos poços. Os poços controle consistiram em culturas de células não tratadas. No poço de controle negativo, 1 ml de meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino foram adicionados, e no controle positivo, foram adicionados 3µl de Tween diluído em 1 ml de 199 com 5% de soro fetal bovino. Ambos foram submetidos às mesmas condições de incubação e temperatura utilizadas para a obtenção dos extratos.

O MTT é uma análise colorimétrica padrão para medir a atividade metabólica das células, por meio de enzimas que reduzem o MTT à formazan (sal azul) na mitocôndria, conferindo à substância uma coloração arroxeadada/azulada <sup>(43)</sup>. Sendo assim, após 24 horas de tratamento, os meios de cultura com os extratos foram retirados e substituídos por 0,5 mL de meio 199 sem a adição de soro fetal bovino, contendo 0,5 mg/mL de MTT (3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio), e incubados com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C por 2 horas <sup>(33, 44)</sup>. Após a incubação, a presença de cristais de formazan foi checada nos 24 poços, com microscópio óptico. O meio de cultura foi aspirado e 500 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada poço. Posteriormente, foi realizada a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 570 nm por meio do espectrofotômetro UV-Visível. As taxas de sobrevivência dos controles representarão 100% de proliferação. O ensaio de MTT foi realizado em triplicata <sup>(37, 40)</sup>.

Os poços controle consistiram em culturas de células não tratadas. No poço de controle positivo, 1 ml de 199 foi adicionado com 5% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e no controle negativo foi adicionado 3µl de Tween diluído em 1 ml de 199 com 10% de soro fetal bovino. Ambos foram submetidos às mesmas condições de incubação e temperatura utilizadas para a obtenção dos extratos.

### **3.6 Análise Estatística**

Os dados obtidos nos ensaios de MTT foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de 2 fatores, seguido pelo teste de Bonferroni, com nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

A análise de variância ANOVA dois fatores mostrou haver relação estatisticamente significativa entre as variáveis A Tabela 1 e Figura 1 apresentam o percentual de proliferação celular após a exposição das culturas de células da conjuntiva aos extratos de resina acrílica previamente submetida aos métodos de desinfecção nos diferentes períodos. Partindo do fato de que a análise no MTT é realizada em relação ao respectivo grupo não estimulado (Controle Negativo), as comparações estatísticas foram realizadas considerando-se os diferentes grupos dentro de um mesmo período de desinfecção. Assim, os grupos que não diferiram estatisticamente do grupo não estimulado foram: Soro e Triclosan no período de 1 dia; Clorexidina, Efferdent e Citronela no período de 7 dias; Clorexidina, Efferdent, Triclosan e Citronela no período de 15 dias; Soro, Sabão e Clorexidina no período de 30 dias; Soro e Triclosan no período de 60 dias; e Soro, Efferdent e Triclosan no período de 90 dias. Sendo assim, podemos observar que não houve um padrão para as diferenças significantes em relação às soluções e períodos avaliados, embora todos os valores encontrados tenham sido maiores que 84% de proliferação celular.

**Tabela 1.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão do percentual de proliferação celular (MTT) para os diferentes agentes desinfetantes analisados.

Grupos	1 dia	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Negativo	100,00 $\pm$ 2,28 Aa	100,00 $\pm$ 3,70 Aa	100,00 $\pm$ 2,69 Aa	100,00 $\pm$ 2,63 Aa	100,00 $\pm$ 3,97 Aa	100,00 $\pm$ 1,23 Aa
Soro	97,92 $\pm$ 2,67 Abc	96,33 $\pm$ 0,86 Bbc	95,17 $\pm$ 2,51 Bc	99,46 $\pm$ 0,67 Aab	101,81 $\pm$ 0,92 Aa	102,02 $\pm$ 2,22 Aa
Sabão	96,19 $\pm$ 2,35 Bab	93,33 $\pm$ 3,25 Bb	85,09 $\pm$ 1,63 Bd	98,70 $\pm$ 0,28 Aa	84,35 $\pm$ 3,60 Bd	89,39 $\pm$ 3,32 Bc
Clorexidina	105,89 $\pm$ 6,77 Ba	98,64 $\pm$ 2,48 Ab	97,61 $\pm$ 0,92 Abc	99,47 $\pm$ 2,23 Ab	94,05 $\pm$ 4,95 Bcd	91,08 $\pm$ 5,92 Bd
Efferdent	94,44 $\pm$ 2,10 Bd	97,01 $\pm$ 1,33 Acd	100,02 $\pm$ 1,38 Abc	105,35 $\pm$ 3,75 Ba	93,72 $\pm$ 6,05 Bd	101,06 $\pm$ 3,12 Ab
Triclosan	97,26 $\pm$ 3,09 Aabc	87,75 $\pm$ 1,92 Bd	98,13 $\pm$ 6,73 Aab	94,31 $\pm$ 4,33 Bc	96,47 $\pm$ 6,66 Abc	100,32 $\pm$ 3,16 Aa
Citronela	95,33 $\pm$ 0,79 Bd	97,25 $\pm$ 2,68 Acd	99,33 $\pm$ 4,47 Ac	121,12 $\pm$ 2,56 Ba	107,39 $\pm$ 4,10 Bb	106,56 $\pm$ 1,40 Bb
Tween	2,30 $\pm$ 0,08 Ba	2,43 $\pm$ 0,15 Ba	2,27 $\pm$ 0,04 Ba	3,17 $\pm$ 0,14 Ba	2,18 $\pm$ 0,18 Ba	1,93 $\pm$ 0,11 Ba

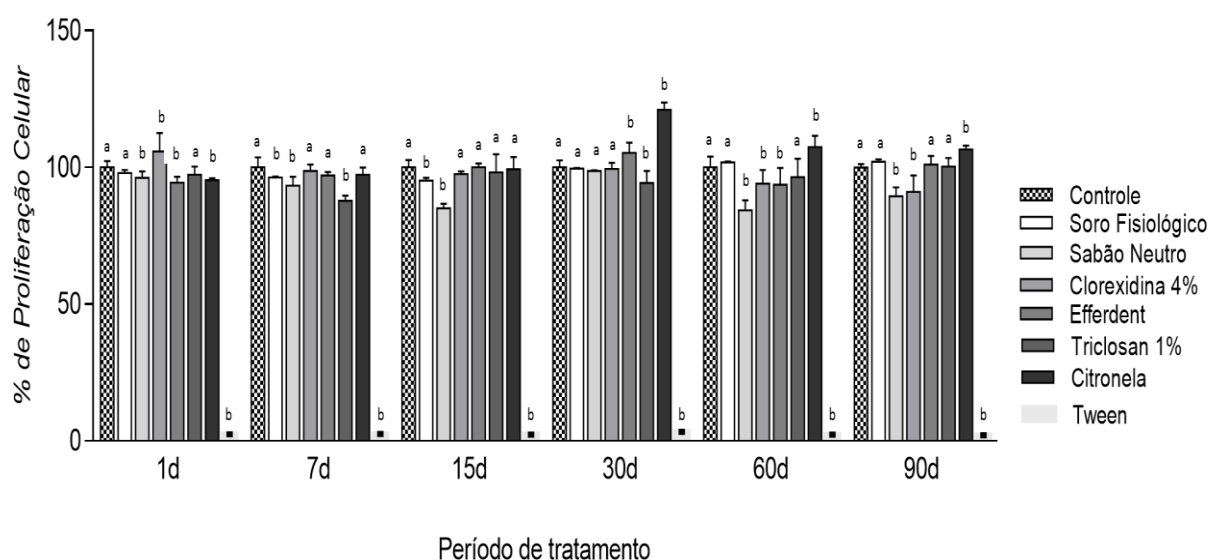
Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo grupo não estimulado. Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Os menores valores de proliferação celular foram encontrados para os grupos submetidos à desinfecção com sabão neutro (84,35% para o período de 60

dias), apresentando estes, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estimulado em 5 dos 6 períodos avaliados (1, 7, 15, 60 e 90 dias). Por outro lado, os maiores valores de proliferação celular foram observados nos grupos desinfetados com óleo essencial de citronela (121,12% no período de 30 dias), sendo estes estatisticamente maiores em relação ao grupo não estimulado em 3 dos 6 períodos avaliados (30, 60 e 90 dias).

Os períodos de desinfecção pareceram não influenciar nos níveis de proliferação celular, uma vez que se observa certa regularidade na mesma ao longo desses períodos.

**Figura 1.** Percentual de proliferação celular para os diferentes métodos de polimerização avaliados. Os resultados mostram média  $\pm$  desvio padrão dos percentuais de proliferação celular. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao respectivo grupo não estimulado (Negativo).





## 5 DISCUSSÃO

As hipóteses nulas testadas de que as soluções desinfetantes a base de Clorexidina 4% e Óleo Essencial de Citronela não apresentariam atividade citotóxica nas células da conjuntiva humana e de que os desinfetantes não seriam tóxicos após 90 dias de desinfecção foram aceitas.

Observou-se em nossos resultados que todos os valores de proliferação celular encontrados foram maiores que 84%. De acordo com a ISO-standard 10993-5, uma substância avaliada *in vitro* pode ser classificada como não-citotóxica (proliferação celular maior que 75%), discreta citotoxicidade (proliferação entre 50 e 75%), moderada citotoxicidade (entre 25 e 50%) e alta citotoxicidade (menor que 25%)<sup>(45)</sup>. Sendo assim, não houve citotoxicidade para nenhuma das soluções desinfetantes avaliadas nesse estudo, independente do período de desinfecção realizado.

De acordo com Goiato et al. 2014<sup>(34)</sup>, quando imersa em um ambiente aquoso, a resina acrílica tende a absorver uma quantidade do líquido através de difusão. As moléculas desse líquido podem penetrar na matriz da resina acrílica e se posicionar entre as cadeias poliméricas. Kalionet al. 2001<sup>(46)</sup> avaliaram a eficácia antimicrobiana de um polímero incorporado com triclosan e relataram que o mesmo permanece encapsulado no interior do corpo do polímero e acaba não se difundindo efetivamente para a superfície, e não contribuindo com o efeito antimicrobiano. Baseando-se nessas informações, sugere-se que, em nosso estudo, a resina acrílica possa ter absorvido parte das soluções utilizadas, as quais podem ter se encapsulado na matriz polimérica, não sendo liberada ao extrato uma quantidade suficiente para causar alguma reação citotóxica nas células.

O grupo imerso em soro fisiológico foi considerado o grupo “não desinfetado”, buscando resultados referentes à citotoxicidade da própria resina acrílica não submetida à desinfecção. Como podemos observar, não foi observada citotoxicidade desse grupo em nenhum dos períodos avaliados. De acordo com Retamoso et al.<sup>(47)</sup> e Saravi et al.<sup>(48)</sup>, a manutenção da resina acrílica em meio aquoso promove a lixiviação de monômeros para esse meio, reduzindo os efeitos deletérios resultantes da irritação química causada pelo meta-metil-metacrilato. Dessa forma, a manutenção das amostras de resina acrílica em soro fisiológico pode ter ocasionado a liberação de monômero residual para o mesmo, evitando a citotoxicidade em contato com as células da conjuntiva ocular.

Dentre as substâncias avaliadas neste estudo, a clorexidina 4%, as pastilhas efervescentes Efferdent e a solução de triclosan 1% apresentaram valores regulares e constantes ao longo do tempo, não mostrando atividade citotóxica em momento algum. A clorexidina é uma solução intensamente usada na odontologia como um agente de prevenção. Estudos clínicos em longo prazo demonstraram que os efeitos adversos gerais e sistêmicos da clorexidina são extremamente raros, indicando geralmente o baixo potencial citotóxico desse agente, o que corrobora com nosso estudo <sup>(29, 49)</sup>.

O triclosan tem sido utilizado amplamente em produtos de higiene pessoal há muitos anos por apresentar uma atividade antimicrobiana de amplo espectro <sup>(12)</sup>. As fórmulas contendo triclosan para uso oral e na pele têm sido testadas em muitos protocolos toxicológicos. Bhargava e Leonard conduziram uma revisão a respeito do triclosan e relataram que estudos investigando géis de banho, loções de corpo e sabonetes contendo entre 0,1% e 1% de triclosan em sua composição demonstram que os produtos contendo até mesmo a maior concentração de triclosan (1%) não apresentaram efeitos citotóxicos e/ou irritantes para pele ou meio oral, o que condiz com os resultados do nosso estudo <sup>(50)</sup>.

As pastilhas efervescentes também são bem conhecidas como agentes de limpeza de próteses totais. A imersão das próteses nesse peróxido alcalino é um método simples de higienização <sup>(51)</sup>. De acordo com Le Cozet *al.* 1999<sup>(9)</sup>, o principal composto da pastilha possivelmente causador de reações seria o perborato de potássio. Entretanto, o fabricante relata não haver resquícios dessa substância na prótese caso o paciente utilize as pastilhas da forma recomendada, ou seja, enxaguando abundantemente a prótese após o protocolo de desinfecção, tal qual foi realizado em nosso experimento, onde todas as amostras foram enxaguadas adequadamente em água corrente por 30 segundos após cada desinfecção, favorecendo a remoção de resíduos das substâncias desinfetante da superfície da resina e evitando sua liberação para o extrato que entraria em contato com as células.

Esse estudo foi baseado no fato de que, devido à possibilidade de um vasto número de porosidades e ranhuras na superfície da resina acrílica, poderia haver um acúmulo de soluções residuais nessa superfície, as quais poderiam ser difundidas para o ambiente <sup>(29)</sup>, no caso, o extrato originado das amostras previamente desinfetadas, o que clinicamente se traduz no fluxo lacrimal em contato

com a superfície posterior da prótese ocular. Entretanto, as amostras de resina do nosso estudo receberam polimento completo, simulando o polimento realizado na prótese ocular antes de ser instalada no paciente, recebendo inclusive polimento com solução diamantada de 1 micra em disco de feltro, o que pode ter proporcionado uma alta lisura superficial e pequena rugosidade de superfície, dificultando o acúmulo de soluções ao longo dos períodos.

Embora poucos estudos tenham avaliado métodos de limpeza de próteses oculares, o mais comum tem sido o uso de água e sabão <sup>(7, 52)</sup>. Verificamos em nosso estudo que, embora não citotóxico, o sabão neutro apresentou, no geral, os menores valores de proliferação celular. Não há relatos na literatura a respeito do potencial citotóxico desse produto, sendo que até mesmo o fabricante relata ser “delicado e seguro para os olhos e pele”. Sendo assim, uma provável hipótese para os menores valores de proliferação celular desse grupo seria de que, por ser o único grupo que recebeu desinfecção mecânica por meio de fricção com gaze embebida no sabão, as amostras podem ter sofrido maior alteração na sua rugosidade, e supostamente, armazenado maior quantidade de solução em sua superfície, sendo esta liberada em maior quantidade para o extrato formado. No estudo de Lira et.al. 2012 <sup>(53)</sup>, que avaliaram a rugosidade superficial de resinas acrílicas de base de dentaduras submetidas à desinfecção mecânica (escovação) e química (imersão em Efferdent e hipoclorito), o único tratamento de desinfecção que promoveu uma maior rugosidade de superfície foi o mecânico realizado por meio da escovação. Ainda, Pellizzaro et.al. 2012 <sup>(54)</sup> relatam que embora os efeitos de limpeza da desinfecção mecânica sejam positivos, a fricção entre com a resina acrílica pode causar danos nesse material, tais como o desgaste e aumento da rugosidade.

Contrariamente ao sabão neutro, os grupos desinfetados por imersão em óleo essencial de citronela apresentaram, no geral, maiores valores de proliferação celular, também não apresentando citotoxicidade às células da conjuntiva humana. Sabe-se que o uso de plantas medicinais em aplicações bactericidas, antiparasitárias, inseticidas, e cosméticas tem aumentado extensivamente, uma vez que a maioria dos óleos essenciais obtidos dessas plantas é conhecida por não ser tóxica <sup>(55-57)</sup>. Dados de um estudo a respeito da toxicidade aguda da citronela indicaram segurança após administração oral e aplicação tópica da mesma <sup>(55, 58)</sup>. O fato do grupo submetido à desinfecção com citronela apresentar maiores valores de proliferação celular pode estar associado ao poder antioxidante desse fitoterápico.

Como demonstrado por muitos estudos, derivados químicos naturais de plantas possuem um efeito de proteção contra a genotoxicidade induzida pelo stress oxidativo <sup>(59-61)</sup>. Dessa forma, as células da conjuntiva humana avaliadas no nosso estudo podem ter sofrido alguma ação protetora decorrente da citronela, e assim, pode ter ocorrido uma maior proliferação das mesmas.

Esse estudo apresenta limitações por ser um estudo *in vitro*, que não reflete todas as condições clínicas do uso da prótese ocular e de sua desinfecção diária. Sendo assim, novos estudos devem ser realizados, avaliando diferentes concentrações de soluções desinfetantes, diferentes rugosidades da resina acrílica, e até mesmo outros métodos de desinfecção da prótese ocular presentes na literatura e nas indicações clínicas.

## **6 CONCLUSÃO**

Podemos concluir que os métodos e soluções desinfetantes utilizados na limpeza de próteses oculares não apresentaram atividade citotóxica em relação às células da conjuntiva ocular humana, independente do intervalo de tempo em que foram realizados, sugerindo-se que seu uso pode ser indicado aos pacientes anoftálmicos portadores desse tipo de prótese.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Huber H, Studer SP. Materials and techniques in maxillofacial prosthodontic rehabilitation. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2002;14(1):73-93.
2. Goiato MC, Fernandes AU, dos Santos DM, Barao VA. Positioning magnets on a multiple/sectional maxillofacial prosthesis. *J Contemp Dent Pract.* 2007;8(7):101-7.
3. Vasquez RJ, Linberg JV. The anophthalmic socket and the prosthetic eye. A clinical and bacteriologic study. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1989;5(4):277-80.
4. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Lyda 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.
5. 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.
6. Pesqueira AA, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Ribeiro Pdo P, Coelho Sinhoreti MA, et al. Effect of disinfection and accelerated aging on color stability of colorless and pigmented facial silicone. *J Prosthodont.* 2011;20(4):305-9.
7. Paranhos RM, Batalhao CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(1):33-8.
8. 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.
9. Le Coz CJ, Bezard M. Allergic contact cheilitis due to effervescent dental cleanser: combined responsibilities of the allergen persulfate and prosthesis porosity. *Contact Dermatitis.* 1999;41(5):268-71.
10. Fisher AA, Dooms-Goossens A. Persulfate hair bleach reactions. Cutaneous and respiratory manifestations. *Arch Dermatol.* 1976;112(10):1407-9.
11. Aiello AE, Larson EL, Levy SB. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? *Clin Infect Dis.* 2007;45 Suppl 2:S137-47.
12. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control.* 2000;28(2):184-96.
13. Bertelsen RJ, Longnecker MP, Lovik M, Calafat AM, Carlsen KH, London SJ, et al. Triclosan exposure and allergic sensitization in Norwegian children. *Allergy.* 2013;68(1):84-91.

14. Frei R, Lauener RP, Cramer R, O'Mahony L. Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis? *Allergy*. 2012;67(4):451-61.
15. Hampton T. Research provides new insights on how hygiene affects asthma and allergies. *Jama*. 305. United States 2011. p. 1400-1.
16. Lachapelle JM. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol*. 2014;24(1):3-9.
17. Anderson SE, Franko J, Kashon ML, Anderson KL, Hubbs AF, Lukomska E, et al. Exposure to triclosan augments the allergic response to ovalbumin in a mouse model of asthma. *Toxicol Sci*. 2013;132(1):96-106.
18. Savage JH, Matsui EC, Wood RA, Keet CA. Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):453-60.e7.
19. Ozkaya E, Kavlak Bozkurt P. An unusual case of triclosan-induced immunological contact urticaria. *Contact Dermatitis*. 2013;68(2):121-3.
20. Tadtong S, Watthanachaiyingcharoen R, Kamkaen N. Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Nat Prod Commun*. 2014;9(2):277-80.
21. Bassolé IHN, Lamien-Meda A, Bayala B, Ogame LC, Ilboudo AJ, Franz C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*. 2011;18(12):1070-4.
22. Khadri A, Neffati M, Smiti S, Falé P, Lino ARL, Serralheiro MLM, et al. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Science and Technology*. 2010;43(2):331-6.
23. Abena AA, Gbenou JD, Yayi E, Moudachirou M, Ongoka RP, Ouamba JM, et al. Comparative chemical and analgesic properties of essential oils of *Cymbopogon nardus* (L) Rendle of Benin and Congo. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2007;4(3):267-72.
24. de Billerbeck VG, Roques CG, Bessiere JM, Fonvieille JL, Dargent R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol*. 2001;47(1):9-17.
25. Viana GS, Vale TG, Pinho RS, Matos FJ. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2000;70(3):323-7.
26. Arabaci T, Turkez H, Canakci CF, Ozgoz M. Assessment of cytogenetic and cytotoxic effects of chlorhexidine digluconate on cultured human lymphocytes. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(5):1255-60.

27. Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(1):652-9.
28. Kohlert C, Schindler G, Marz RW, Abel G, Brinkhaus B, Derendorf H, et al. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *J Clin Pharmacol.* 2002;42(7):731-7.
29. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003;30(5):532-6.
30. Barisani-Asenbauer T, Inic-Kanada A, Belij S, Marinkovic E, Stojicevic I, Montanaro J, et al. The ocular conjunctiva as a mucosal immunization route: a profile of the immune response to the model antigen tetanus toxoid. *PLoS One.* 2013;8(4):e60682.
31. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Cell viability score as an integrated indicator for cytotoxicity of benzalkonium chloride-containing antiglaucoma eyedrops. *Biocontrol Sci.* 2012;17(3):121-8.
32. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1995;8(2):122-8.
33. Bal BT, Yilmaz H, Aydin C, Karakoca S, Yilmaz S. In vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: effect of accelerated aging. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;89(1):122-6.
34. Goiato MC, Dos Santos DM, Andreotti AM, Nobrega AS, Moreno A, Haddad MF, et al. Effect of beverages and mouthwashes on the hardness of polymers used in intraoral prostheses. *J Prosthodont.* 2014;23(7):559-64.
35. 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.
36. Filie Haddad M, Coelho Goiato M, Micheline Dos Santos D, Moreno A, Filipe D'almeida N, Alves Pesqueira A. Color stability of maxillofacial silicone with nanoparticle pigment and opacifier submitted to disinfection and artificial aging. *J Biomed Opt.* 2011;16(9):095004.
37. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007;24(1):52-7.
38. Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(3):642-52.



39. Baudouin C, Riancho L, Warnet JM, Brignole F. In vitro studies of antiglaucomatous prostaglandin analogues: travoprost with and without benzalkonium chloride and preserved latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(9):4123-8.
40. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont*. 2004;17(3):340-4.
41. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostene W, Baudouin C, Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis*. 2012;18:851-63.
42. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*. 2010;316(7):1271-81.
43. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014;5(2):69-76.
44. Bural C, Aktas E, Deniz G, Unlucerci Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(4):306-12.
45. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva:ISO; 2009. Geneva2009.
46. Kalyon BD, Olgun U. Antibacterial efficacy of triclosan-incorporated polymers. *Am J Infect Control*. 2001;29(2):124-5.
47. Retamoso LB, da Cunha Tde M, Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Romanos MT, et al. In vitro cytotoxicity of self-curing acrylic resins of different colors. *Dental Press J Orthod*. 2014;19(4):66-70.
48. Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F. Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)*. 2012;9(4):180-8.
49. Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. *Journal of Dental Research*1989.
50. Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control*. 1996;24(3):209-18.
51. de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos Hde F, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and mutans streptococci in denture biofilm. *Gerodontology*. 2011;28(4):264-70.

52. Nuti Sobrinho A, Garcia de Lima E, Mattos MG, Watanabe I. A study of ocular prostheses. I. Manufacture and indications for use. *Rev Fac Odontol Ribeiro Preto*. 1986;23(2):135-43.
53. Lira AF, Consani RL, Mesquita MF, Nobilo MA, Henriques GE. Effect of toothbrushing, chemical disinfection and thermocycling procedures on the surface microroughness of denture base acrylic resins. *Gerodontology*. 2012;29(2):e891-7.
54. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanita PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J*. 2012;23(5):547-54.
55. Costa CA, Bidinotto LT, Takahira RK, Salvadori DM, Barbisan LF, Costa M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(9):2268-72.
56. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446-75.
57. Fandohan P, Gnonlonfin B, Laleye A, Gbenou JD, Darboux R, Moudachirou M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(7):2493-7.
58. Opdyke D J L. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet. Toxicol.:* *Food Cosmet. Toxicol.*; 1976. p. 455-7.
59. Sinha S, Biswas D, Mukherjee A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1521-7.
60. Gleis M, Pool-Zobel BL. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicol In Vitro*. 2006;20(3):295-300.
61. Plazar J, Filipic M, Groothuis GM. Antigenotoxic effect of Xanthohumol in rat liver slices. *Toxicol In Vitro*. 2008;22(2):318-27.