



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAROLINA DE ASSIS BARROS BRITO

**Avaliação da eficácia de substâncias naturais
antimicrobianas e seu efeito em determinadas
propriedades do gesso tipo IV**

Araraquara

2013



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAROLINA DE ASSIS BARROS BRITO

**Avaliação da eficácia de substâncias naturais antimicrobianas
e seu efeito em determinadas propriedades do gesso tipo IV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção de Título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho

Co-Orientador(a): Denise Madalena Palomari Spolidório

Araraquara

2013

CAROLINA DE ASSIS BARROS BRITO

**Avaliação da eficácia de substâncias naturais antimicrobianas
e seu efeito em determinadas propriedades do gesso tipo IV**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho

2º Examinador: Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva

3º Examinador: Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani

Araraquara, 04 de março de 2013

Dados Curriculares

CAROLINA DE ASSIS BARROS BRITO

Nascimento: 15/03/1988. Brasília/DF

Filiação: Francisco de Assis Brito

Maria Eduarda de Barros

2006/2011 – Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

2011/2012 – Mestrado em Reabilitação Oral, Área de Concentração Prótese. Faculdade de Odontologia de Araraquara/Universidade Estadual Paulista

2011/2012 – Estágio de Docência em Prótese Parcial Fixa e sobre implante. Faculdade de Odontologia de Araraquara/Universidade Estadual Paulista

2012/2012 – Estágio de Docência em Prótese Total. Faculdade de Odontologia de Araraquara/Universidade Estadual Paulista

Dedicatória

A Deus,

Pai... É chegada a etapa final deste trabalho. Porém, este momento só foi possível graças a todos que estiveram presentes comigo, por Sua intercessão.

Obrigada Pai, por ter me concedido a graça de ter sido gerada por pais tão maravilhosos, os quais são fonte de amor, inspiração, perseverança, força, e moral. Os pilares da minha vida, Francisco de Assis Brito e Maria Eduarda de Barros.

Agradeço também, Pai, pela minha segunda mãe, Jaqueline Conceição Ruthes. Uma pessoa serena, dotada de uma alma unificadora.

Foi por eles na minha vida que eu sou o que eu sou, e sei que posso ser sempre algo mais.

Obrigada Pai, por meus quatro melhores amigos:

Felipe Eduardo, Ygor Eduardo, Rodolfo e Vitorugo. Eles sempre me encheram de alegria e força em cada momento que fraquejei.

É pela alegria de ter estas pessoas em minha vida, Senhor, que dedico este trabalho. O Senhor me encheu com sua luz, mais uma vez. Dai-me forças para continuar a crescer,

Que assim seja.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, que me recebeu como uma nova filha. Obrigada por ter acreditado em mim e ter me prestigiado com sua amizade. Agradeço-lhe por todos os ensinamentos e todo o apoio que me foi proporcionado.

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório, pelo acolhimento no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia. Uma pessoa acolhedora e dedicada a pesquisa e ética.

À amiga de todos os momentos Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva. Você esteve presente nas minhas conquistas mais importantes, nos melhores e piores momentos. Minha mãe de coração, muito obrigado por tudo. Sua presença na minha vida foi fundamental para o meu crescimento profissional como também para o meu crescimento pessoal. Você é espelho de competência, dedicação e amor ao trabalho.

Ao meu amigo Rodrigo de Paula, pela ajuda de grande valia no trabalho e disposição todas as horas. Muito obrigado pela amizade e pelos ensinamentos e por ter me dado todo o apoio desde o primeiro dia de mestrado. Sua amizade me incentivou muito para a vida acadêmica! Obrigada pela grande disposição, competência, dedicação e amor ao trabalho.

Aos meus amigos Fabiana Onishi, Paulo Calazans, Paula Olenscki, Erica Zanini, e Thomas Medeiros, que estiveram comigo durante o mestrado. Obrigada pela

alegria, espontaneidade, disposição e vontade de aprender. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” Cora Coralina.

À Marilia pelos momentos de troca de experiência dos anos em Araraquara, e pela valiosa ajuda na estatística.

À Juliana Pirola, técnica do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo carinho e pela valiosa ajuda na realização dos trabalhos de pesquisa realizados no Laboratório.

À minha família de Araraquara, Fabiano Neves, Vinicius Krieger, Rosa Virginia, Tamires Garotti, e Katri Ranta, grandes pessoas que participaram do meu dia-a-dia. Muito obrigada pelo carinho e momentos de alegria na nossa casa!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa da sua diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e sua Vice-Diretora, Profa. Dra. Elaine Massucato.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Júnior.

À Coordenação da Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani.

Ao Conselho Tecnológico de Desenvolvimento Pessoal – CNPq, pela bolsa concedida.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela valiosa participação em meu crescimento profissional.

Aos colegas do curso de mestrado, especialmente ao meu grande amigo Geraldo Camilo por estar comigo em mais uma etapa!

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pela valiosa ajuda prestada durante todo o curso, principalmente à Martinha e à Dulce, eternas amigas!

**"O conhecimento é como uma esfera,
quanto maior o seu volume,
maior é o seu contato com o desconhecido."**

Blaise Pascal

Brito CAB. Avaliação da eficácia de substâncias naturais antimicrobianas e seu efeito em determinadas propriedades do gesso tipo IV [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

O objetivo foi avaliar o efeito de desinfecção, de soluções incorporadas em gesso odontológico, contra um grupo de microrganismos, e verificar as alterações morfológicas e propriedades físicas e mecânicas do gesso. O digluconato de clorexidina (2%), óleo de melaleuca (20%); própolis em solução hidroalcoólica (14%); extrato de própolis seco (4,4% da massa de gesso) foram incorporados no gesso tipo IV. As propriedades antimicrobianas foram avaliadas por teste de difusão em ágar em 1 hora, 24 horas, e 7 dias após a confecção do modelo em gesso (n=8), para os microrganismos comuns da cavidade oral: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida Albicans*. As propriedades físicas e mecânicas do gesso modificado (n=10) foram avaliadas por: resistência à compressão, reprodução de detalhes, alteração dimensional, e tempo de presa, já as alterações morfológicas foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que o digluconato de clorexidina á 2% foi eficaz contra todos os microrganismos, exceto *Candida Albicans*. O extrato hidroalcoólico de própolis foi eficaz para *S.Aureus*, porém com efeito antimicrobiano menor que o digluconato de clorexidina 2%. O extrato de própolis hidroalcoólico demonstrou efeito antimicrobiano somente para os microrganismos *Candida Albicans*, e *S. Aureus*. As alterações mecânicas e físicas encontradas com a incorporação de antimicrobianos ao gesso estão dentro das especificações da ADA, ISO e Anusavice & Phillips, citadas na literatura odontológica. Como conclusão a clorexidina á 2% tem ótimas propriedades antimicrobianas para ser incorporado ao gesso odontológico, e não apresentaram alterações mecânicas, físicas e morfológicas significativas.

Palavras-chave: sulfato de cálcio , própolis, desinfetantes.

Brito CAB. Evaluation of the efficacy of natural antimicrobial substances and their effect on certain properties of type IV gypsum [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

This study evaluated the antimicrobial activity of disinfectant agents incorporated into type IV dental stone at the time of mixing against some microorganisms typically of oral cavity. 2% chlorhexidine digluconate solution (CHX), 20% tea tree oil (TTO), 14% alcohol propolis extract, powder of propolis extract in 4.4% proportion of the dental stone mass and mixed with sterile distilled water was incorporated in dental stone type IV. The antimicrobial properties have been evaluated for Agar diffusion test in 1 hour, 24 hours and 7 days, used for the following microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. The properties of modified gypsum (n = 10) were measured: compressive strength, detail reproduction, dimensional alterations, and setting time, since the morphological alterations were analyzed by scanning electron microscopy. CHX 2% incorporated in dental stone demonstrated antimicrobial activity against all microorganisms, with the exception of *C. albicans*. 14% alcohol propolis extract was effective for *S. Aureus*, therefore with lower effect when incorporated at dental stone. It showed statistical difference between disinfectant agents incorporated in dental stone group and control substance with paper for all groups with chlorhexidine digluconate 2%, except *S. Aureus*. 14% alcohol propolis extract in paper group was demonstrated antimicrobial activity against *S. Aureus* and *C. albicans*. The mechanical and physical changes found with the incorporation of antimicrobial agents to gypsum are within normal limits according to ADA specification, ISO, and Anusavice. It was demonstrated that 2% chlorhexidine digluconate has great antimicrobial properties to be incorporated into the gypsum dental, and did not present significant physical and mechanical changes. The study of other substances may have antimicrobial activity with higher concentrations, but more studies are needed.

Keywords: calcium sulfate, propolis, disinfectants

SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
2 Revisão da literatura	
2.1 Barreiras para contaminação cruzada.....	15
2.2 Incorporação de antimicrobianos ao gesso odontológico.....	19
2.3 Agentes antimicrobianos naturais: própolis.....	20
2.4 Agente antimicrobiano: digluconato de clorexidina.....	23
2.5 Agentes antimicrobianos naturais: óleo de melaleuca.....	27
3 Proposição.....	30
4 Material e método	
4.1 Análise antimicrobiana.....	31
4.1.1 Grupos.....	32
4.1.2 Confeção dos moldes.....	32
4.1.3 Confeção dos corpos-de-prova	33
4.1.4 Preparo das suspensões microbianas.....	34
4.1.5 Preparo das placas de petri.....	34
4.1.6 Inoculação do meio de cultura, inserção dos corpos-de-prova e incubação.....	35
4.1.7 Teste de difusão em ágar.....	35
4.1.8 Interpretação dos resultados.....	36
4.2 Análises mecânicas, físicas e morfológicas	
4.2.1 Grupos de amostras.....	37
4.2.2. Análise do tempo de presa.....	38
4.2.3 Análise da reprodução de detalhes.....	39
4.2.4. Mensuração da estabilidade dimensional linear.....	40
4.2.5. Resistência à compressão.....	41
4.2.6. Análise morfológica.....	42
4.3 Metodologia	56
5 Resultado	
5.1 Efeitos antimicrobianos.....	59

5.2 Alterações mecânicas, físicas e morfológicas.....	59
6 Discussão	
6.1 Efeitos antimicrobianos.....	63
6.2 Alterações mecânicas, físicas e morfológicas.....	65
7. Conclusão	
7.1 .Das análises físicas mecânica.....	68
7.2 Da análise Antimicrobiana.....	68
7.3 Conclusão geral.....	68
Referências.....	69
Anexos	75

1 INTRODUÇÃO

Na cavidade oral existem inúmeros microrganismos na saliva e no sangue que podem desenvolver infecções oportunistas. Microrganismos patogênicos como *E. Coli*, *C. Albicans*, e *S. Auereus* podem contaminar os materiais odontológicos que entram em contato com estes fluidos orais. Assim, vários estudos^{28,37} demonstraram a necessidade de procedimentos que atuem como barreira contra a contaminação cruzada.

A adição de desinfetantes ao gesso odontológico vem ganhando ênfase^{2, 22, 34, 41, 48}, como é o caso da substância desinfetante digluconato de clorexidina^{32, 42}. Porém, algumas substâncias naturais se destacaram com propriedades antimicrobianas, por ser de fácil obtenção e baixo custo, tais como a própolis e o óleo essencial da Melaleuca.

Produtos naturais têm sido utilizados há muito anos na medicina popular. A descoberta de novas moléculas provenientes de plantas ou derivados semissintéticos, tem estimulado a indústria farmacêutica a pesquisar intensivamente os produtos de origem natural. Entre esses produtos está o óleo de Melaleuca (tea tree oil – TTO) e a própolis.

Dados recentes demonstraram que a atividade do TTO é de amplo espectro, sendo antibacteriana, antifúngica e antiviral^{10-11, 35, 27}.

Messagera et al.³⁵(2005) testaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de tea tree oil (TTO) e esta pareceu ser dependente da formulação e da concentração, da concentração incorporadas e, por último, do microrganismo. Os autores concluíram que as formulações, de uma forma geral, alcançaram elevada redução no número de células bacterianas.

Já o própolis é um material resinoso que as abelhas (*Apis mellifera L.*) produzem a partir do pólen várias espécies de plantas misturado com sua saliva, com o objetivo de impedir que microrganismos se proliferem dentro da colméia.

Popova et al.⁴² (2009), isolaram vários compostos do própolis cretense. A atividade antimicrobiana dos compostos foi testada contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e contra alguns fungos patogênicos, tendo como resultado a constatação de uma ampla ação antimicrobiana.

De acordo com o avanço dos procedimentos para criar barreiras de contaminação cruzada, os materiais odontológicos devem apresentar algumas características específicas as quais determinam o equilíbrio entre suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Assim, considerando a escassez de trabalhos científicos na literatura odontológica para a incorporação de substâncias antimicrobianas de origem natural no controle da contaminação cruzada, o presente estudo avaliou o efeito antimicrobiano da incorporação de extrato de própolis, óleo de Melaleuca (TTO), e digluconato de clorexidina(CHX) em um gesso odontológico tipo IV (Fuji Rock EP, GC Europe, Leuven, Belgium), buscando melhor controle na infecção cruzada em trabalhos protéticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Barreiras para Contaminação Cruzada

Na clínica odontológica, vários procedimentos provocam a contaminação por microrganismos patogênicos. Podem-se citar as impressões das arcadas dentárias com materiais de moldagem, por isso a importância de se fazer um controle da infecção cruzada. Na literatura encontramos vários estudos sobre tentativas de controle de infecção cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese.

Minagi et al.³⁶ (1986), avaliaram a influência de longos períodos de imersão com soluções de hipoclorito de sódio 6% e glutaraldeído 2%, analisando a estabilidade dimensional dos materiais de moldagem (siliconas de adição e hidrocolóide irreversível). O estudo concluiu que para os materiais à base de silicone, recomenda-se a imersão em hipoclorito de sódio 6% por um período de 60 minutos, já para o hidrocolóide irreversível, recomenda-se a imersão em solução de glutaraldeído 2% pelo mesmo tempo. Tendo tais informações é possível evitar possíveis alterações nos trabalhos protéticos, diminuindo possíveis transtornos.

Tebrock et al.⁵⁴ (1989) relataram que imersão de modelos de gesso em solução de hipoclorito de sódio na concentração 0,525% é um eficaz agente antimicrobiano, se deixado agir por 30 minutos. As impressões contaminadas com *B. subtilis* foram utilizadas para fazer moldes, e posteriormente, cultivadas. Nenhum crescimento do organismo de teste ocorreu nas placas inoculadas a partir dos moldes desinfetados.

Mansfield, White.³⁴ em 1991 utilizaram *E. Coli*, *S. Mutans*, *S. Aureus*, *S. Marcescens*, e *B. Subtilis* para contaminar uma impressão de silicone esterilizado. Gesso combinados com 4 soluções desinfetantes (Iodóforo, glutaraldeído neutro, fenol, ou hipoclorito de sódio) foram usados para fazer moldes. Após 1 hora os moldes com hipoclorito de sódio e glutaraldeído reduziu o número de organismos para o nível do controle negativo.

Jagger et al.²³ (1995), pesquisando 800 laboratórios, encontraram que em 175 deles as medidas de proteção contra infecção cruzada eram insatisfatórias, mostrando a importância de se passar maiores informações aos técnicos de laboratório de prótese.

Mitchell et al.³⁷ (1997), utilizaram modelos contaminados com saliva, onde alguns foram desinfetados e outros não. Os desinfetados ficaram submersos em glutaraldeído por 20 segundos e não produziram nenhuma colônia bacteriana. Já os que foram lavados somente com água propiciaram a formação de algumas colônias. Os que foram lavados com água e sabão resultaram menos colônias do que os lavados somente com água. Como era esperado no estudo, os que não receberam nenhum tipo de desinfecção apresentaram a produção de várias colônias bacterianas, portanto o estudo mostra a importância de se promover a desinfecção de modelos em trabalhos protéticos como prevenção de possível contaminação cruzada. Uma observação importante deste estudo é o fato de que mesmo após 4 horas da obtenção do modelo, não houve alteração do número de colônias bacterianas no mesmo.

Kugel et al.²⁶ (2000), mostraram que há certa falta de comunicação entre técnicos de laboratório de prótese e cirurgiões-dentistas, favorecendo a disseminação da infecção cruzada.

Soares, Ueti⁵² (2001), realizaram um estudo comparativo da alteração dimensional, textura superficial e resistência à compressão de troqueis de gesso, submetidos à desinfecção química por imersão durante 30 min em solução de hipoclorito de sódio a 1% ou glutaraldeído alcalino a 2,2% (com ou sem lavagem prévia em ultrassom) e pela adição de glutaraldeído alcalino a 2,2% ou hipoclorito de sódio a 5% à manipulação dos gessos IV e V, na confecção de troqueis. Concluíram que a desinfecção química: (1) não provocou alteração dimensional significativa nos troqueis de gesso; (2) determinou alterações na textura superficial dos troqueis conforme o método de desinfecção utilizado e (3) tanto a imersão por 30 min como a adição de solução desinfetante à mistura do gesso determinaram redução na resistência à compressão dos troqueis.

Silva, Salvador⁴⁹ (2004), avaliaram a estabilidade dimensional das siliconas de condensação pesadas e leves para moldagem odontológica, quando imersas em solução desinfetante por 10 e 20 minutos, relacionando a importância da biossegurança no manuseio destes materiais. Os materiais de moldagem testados foram: Optosil Confort e Xantopren VL Plus; e as soluções desinfetantes foram o hipoclorito de sódio a 1% (Solução de Milton) e o glutaraldeído a 2% (Glutaron II). Foram realizadas 50 moldagens,

executadas pela técnica em passo único. Para assegurar a completa polimerização o material foi removido após 7 minutos e submetido à imersão nas soluções desinfetantes nos tempos determinados, sendo um grupo controle representado por moldes sem imersão. Os resultados indicaram que as soluções testadas podem ser seguramente empregadas na desinfecção de siliconas de adição durante os procedimentos clínicos de reabilitação protética.

Majewski et al.³³ (2004), avaliaram 30 laboratórios de prótese nas cidades de São José dos Campos e Jacareí, ofereceu um resultado alarmante. Mais de 70% dos técnicos que participaram do estudo desconhecem o perigo de contaminação cruzada entre consultório e laboratório protético, favorecendo com que a preocupação com a biossegurança no local seja pequena.

Segundo Lindsay, Von Holy²⁹ em 2006, a formação de biofilme é o estilo de vida microbiana predominante em ambientes naturais e artificiais, e ocorre em todo tipo de superfície. Vários tipos de superfícies em cenários clínicos são propensos ao desenvolvimento de biofilme, e um risco aumentado à doença pode ser uma consequência direta dessa formação. Embora se aceite que biofilmes são onipresentes na natureza, o significado de biofilmes em ambiente clínico, principalmente com relação a seu papel nas infecções médicas, é muitas vezes subestimado.

O autor Abdullah³ (2006) fez um estudo sobre desinfetantes de moldes dentários através da imersão. Os resultados demonstraram um aumento significativo da dimensão linear dos modelos de gesso depois de repetidas imersões em solução de hipoclorito de sódio e água destilada. Em relação à resistência a compressão, houve diminuição para ambos os modelos de gesso. Apesar dos valores encontrados não serem os ideais. Quanto aos detalhes de superfície, ambas as soluções causaram algum dano, porém não significativos.

Moura et al.³⁸ (2010), avaliaram a eficácia antimicrobiana do vapor de hipoclorito de sódio 2,5% e 5,25% na desinfecção de moldes de hidrocolóide irreversível em Caixa Umidificadora e Caixa Nebulizadora. Os resultados mostraram que em todos os grupos observou-se maior número médio de colônias dos grupos controles em relação aos experimentais. O estudo concluiu que o hipoclorito de sódio 5,25% poderá ser utilizado

para desinfecção nos métodos Caixa Umidificadora e Caixa Nebulizadora, no entanto, a concentração 2,5%, só será eficaz quando utilizada no método Caixa Nebulizadora.

Surendra et al.⁵⁴(2011), mostraram que ao autoclavar materiais de moldagem elastoméricos, em seu estudo, foram usado o polivinil. Somente foi encontrada alteração dimensional quando foi feita a medida imediatamente após a esterilização. Já uma medição feita 24 h depois da autoclavagem não mostrou nenhum tipo de alteração dimensional, sendo, portanto conveniente esperar 24 h para que se possam vaziar os moldes de material elastomérico quando estes forem autoclavados. Esse é um processo, portanto, satisfatório para impedir infecções cruzadas entre laboratório de prótese e consultório odontológico.

Segundo Fluent, Molinari²⁰ (2011), os técnicos de laboratórios protéticos devem se precaver de possíveis infecções assim como os cirurgiões-dentistas. O incorreto manuseio de aparelhos protéticos, moldes ou modelos contaminados podem provocar a chamada infecção cruzada, que pode ser evitada com protocolos de biossegurança, assim como uma boa comunicação entre dentistas e técnicos de laboratório sobre o assunto, proporcionando um ambiente de trabalho mais seguro evitando-se acidentes ocupacionais.

Barlean et al.⁷ (2011), concluíram que entre os técnicos de prótese dentária, 90,2% dos técnicos afirmam a necessidade de promover desinfecção das próteses quando chegam do consultório odontológico. Os equipamentos de proteção são usados por 49,1% dos técnicos de prótese dentária incluídos neste estudo (18,0% usam o equipamento completo, 45,9% usam óculos de segurança, 37,7% usam máscaras e 19,6% usam luvas e toca). Dos laboratórios analisados 59,1% são equipados com ventilação de ar, enquanto que a desinfecção de superfície é uma prática comum em 85,2%. Os resultados também mostraram que 62,1% desinfetam as impressões, 26,1% a prótese final e 25,0% desinfetam os registros interoclusais. Os programas educacionais para sensibilizar os técnicos de prótese dentária sobre o controle de infecção, adotando as medidas de prevenção mais eficazes, são essenciais para reduzir a incidência de técnicos, dentistas e pacientes a essa exposição aos microrganismos.

2.2 Incorporação de antimicrobianos ao gesso odontológico

O gesso está presente em vários processos odontológicos, sendo este um foco de infecção cruzada, assim sendo é satisfatório criar protocolos de desinfecção para esse material.

Segundo Ivanovski et al.²² (1995), a interação entre clínica odontológica e laboratório de prótese é uma das áreas mais difíceis, partindo de um ponto de vista de controle de infecção cruzada, e a prevenção de moldes contaminados é a situação ideal para prevenir este alto índice de contaminação. Neste estudo foi testado o potencial de desinfecção de desinfetantes incorporados ao gesso, contra alguns microrganismos, e o efeito disso sobre as propriedades do modelo. Dentre as soluções testadas, o digluconato de 0,2% mostrou-se ineficaz. Concentrações mais elevadas desta substância podem justificar estudos posteriores. Os autores destacaram que concentrações mais elevadas desta solução desinfetante podem justificar estudos posteriores.

Abdelaziz et al.² em 2002 testaram as propriedades do gesso após a incorporação de soluções desinfetantes no momento da manipulação do gesso, e também a adição de substâncias que, segundo a literatura, podem diminuir os efeitos adversos sobre a rugosidade da superfície do gesso. As soluções desinfetantes testadas foram 0,1% de iodo povidona e 0,525% de NaOCl. As substâncias adicionadas para minimizar os efeitos adversos foram goma-arábica e hipoclorito de sódio. Os resultados deste estudo mostraram que a adição de soluções desinfetantes em quantidades maiores produziu piores rugosidades na superfície do material. No entanto, a incorporação de goma-arábica ou hipoclorito de sódio antes da mistura do gesso promoveu melhora nesta propriedade, com níveis próximos aos do grupo controle.

Twomey et al.⁵⁵ (2003) realizaram um estudo a fim de desenvolver um gesso pedra dental com propriedades de desinfecção, compressão e resistência à tração adequada. Utilizou a incorporação de hipoclorito de cálcio em 0 a 1,5% em gesso dental, e testou sobre o cultivo de *B. Subtilis*. Através deste, concluiu-se como sendo possível a preparação de um gesso pedra tipo V contendo um desinfetante e, que concomitantemente, atenda às necessidades das propriedades mecânicas.

Lucas et al.³¹(2008), em um estudo sobre incorporação de agentes desinfetantes ao gesso tipo IV, utilizaram os seguintes grupos com hipoclorito de sódio, glutaraldeído 2%;

Digluconato de Clorexidina 2%; em substituição de 100% da água e em 50% da água, e outro grupo somente com água. Os resultados do estudo mostraram que a incorporação do glutaraldeído 2% e digluconato de clorexidina 2%, não ocasionou prejuízos à capacidade de reprodução de detalhes do gesso tipo IV. A estabilidade dimensional linear do gesso espatulado com esses mesmos produtos apresentou uma expansão estatisticamente semelhante ao do grupo controle. O tempo de presa apresentou aumento em todos os corpos-de-prova avaliados, porém o glutaraldeído 2% e o digluconato de clorexidina 2% obtiveram valores dentro dos padrões exigidos pela norma da I.S.O. Independentemente da diluição.

Pereira et al.³⁴ (2011), avaliaram em seu estudo a atividade antimicrobiana de dois agentes desinfetantes (digluconato de clorexidina 2% e cloridrato de clorexidina 98%) incorporados ao gesso IV durante sua manipulação. No teste microbiológico de difusão em Agar foram utilizados microrganismos s característicos da cavidade oral: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. As amostras foram separadas em: gesso manipulado com água destilada esterilizada (controle positivo); gesso e papel manipulado com solução de digluconato de clorexidina 2%; 4) gesso e papel com a incorporação de cloridrato de clorexidina 98% em pó, na proporção de 1% da massa do gesso, e manipulado com água destilada esterilizada. Depois 1 hora e 24 horas do vazamento do gesso, e em seguida, testado por difusão em ágar. Os resultados encontrados demonstraram que os agentes desinfetantes analisados apresentaram atividade antimicrobiana quando misturados ao gesso, com exceção para *Candida albicans*.

2.3 Agente Antimicrobiano: digluconato de clorexidina

O digluconato de clorexidina já é um produto bem conhecido na literatura odontológica, usado como método de desinfecção em várias áreas, pois a mesma possui uma potente eficácia antibacteriana.

Yesilsoy et al.⁵⁹ (1995), analisando produtos que podem ser utilizados no tratamento endodôntico, concluiu que o Peridex (digluconato de clorexidina 0,12%), assim como o Therasol, podem ter uma potente ação antimicrobiana contra *S. mutans*, *P. micros*, *P. intermedius*, e *P. gingivalis*. O meio utilizado para os testes foram tecidos subcutâneos de

animais. Os testes foram feitos após duas horas de injeção do produto, dois dias e duas semanas, mostrando como resultado uma satisfatória ação antimicrobiana.

Segundo Zamany et al.⁶⁰ (2003), o digluconato de clorexidina é um potente agente antimicrobiano, e é diferente das outras soluções desinfetantes devido a sua capacidade de se ligar a molécula de hidroxiapatita, criando um efeito residual. Os resultados deste estudo mostraram que o digluconato de clorexidina foi mais eficaz na eliminação de bactérias em comparação com o grupo controle, no qual foi usada solução salina.

Ainda demonstrando a efetividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina em diversas áreas da odontologia, Schwach-Abdellaoui et al.⁴⁷ (2003) afirmaram que a clorexidina possui efeitos benéficos quando utilizada em fases operatória e não operatória durante o tratamento periodontal cirúrgico e não cirúrgico, tais como ação de uma superfície bacteriostática e liberação gradual. A ação antibacteriana do digluconato de clorexidina ocorre pelo aumento da permeabilidade da membrana celular e sua estrutura química permite que ela permaneça na cavidade oral durante um prolongado período de tempo, mesmo após uma lavagem.

Estrela et al.¹⁶ em 2003 avaliaram o efeito antimicrobiano da clorexina a 2% e do hipoclorito de sódio a 2% através de testes de difusão em Ágar e de exposição direta utilizando cinco tipos de cepas de microrganismos s: *S. Aureus*, *E. Faecalis*, *P. Aeruginosa*, *B. Subtilis*, *C. Albicans* e uma mistura destes. No estudo, os resultados foram favoráveis para todos os indicadores biológicos testados. Os resultados foram comprovados pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano em torno de discos de papéis contendo as substâncias, no teste de difusão em Ágar; e pela análise da turvação do meio de cultura, no teste de exposição direta.

Em outro estudo, Estrela et al.¹⁷ em 2003, determinaram a concentração inibitória mínima e a atividade antimicrobiana de 4 tipos de soluções irrigadoras mais frequentemente utilizadas em tratamentos endodônticos, entre elas o digluconato de clorexidina 2%, realizando teste de exposição direta em cepas dos mesmos microrganismos s no estudo citado acima. O crescimento bacteriano foi analisado pela turvação do meio de cultura e comprovação pela coloração de Gram. Como resultado, o digluconato de clorexidina 2% apresentou efetividade sobre os microrganismos s *S.*

aureus, *E. Faecalis* e *C. albicans* e foi inefetivo sobre *P. Aeruginosa*, *B. Subtilis* e a cultura mista.

Vianna et al.⁵⁷ (2004), tiveram como objetivo investigar in vitro a ação antimicrobiana de digluconato de clorexidina em três concentrações (0,2%, 1%, e 2%) nas formas de gel e líquido, comparados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%). O estudo mostrou diferentes tempos de ação antimicrobiana, o gel e o líquido de 2% de digluconato de clorexidina eliminou *S.aureus* e *C. albicans* em 15 segundos e a mesma forma em gel eliminou *E. Faecalis* em 1 minuto. Todos os irrigantes do estudo eliminaram *P. endodontalis*, *P.gingivalis* e *P.intermédia* em 15 segundos. O tempo encontrado para a digluconato de clorexidina em forma líquida a 1% e 2% para a eliminação de todos os microrganismos s foi o mesmo necessário para o hipoclorito de sódio a 5,25

Dumani et al.¹³ (2007) avaliaram a eficácia das soluções desinfetantes de digluconato de clorexidina na concentração 2% e hipoclorito de sódio a 1% e 5%, em diferentes intervalos de tempo, sobre cones endodônticos. A solução de o digluconato de clorexidina é eficaz contra várias bactérias, tanto gram positivas quanto gram negativas, e também contra leveduras. Seu mecanismo de ação envolve a interação entre carga positiva da molécula de CHX e grupos fosfato carregada negativamente na parede da célula bacteriana, o que permite que a molécula de CHX penetre no microrganismo. Os resultados desde estudo mostraram que o digluconato de clorexidina 2% foi eficaz após 5 minutos de tratamento.

Sassone et al.⁴⁵ em 2008, testaram a atividade antimicrobiana de solução de hipoclorito de sódio a 1% e 5% e de digluconato de clorexidina a 0,12%, 0,5% e 1%, contra algumas amostras bacterianas, com ou sem adição de material orgânico. Segundo os pesquisadores, o digluconato de clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro e que apresenta relativamente baixos níveis de toxicidade. No teste de difusão em ágar, que é um dos testes mais utilizados para se testar atividade antimicrobiana, discos de papel previamente saturados com solução desinfetante foram colocados em placas de Petri contendo ágar e um determinado microrganismo. Após certo período de tempo, se a solução apresentar atividade antimicrobiana, haverá halos de inibição de tamanhos variáveis ao redor dos discos de papel. Neste estudo, em cada placa, também foi colocado um disco de papel embebido em solução salina estéril, como controle

negativo. O digluconato de clorexidina 0,5% e 1% apresentaram atividade antibacteriana contra todas as amostras testadas.

Slot et al.⁵⁰ (2011) fizeram uma revisão literária sobre o efeito da utilização do verniz de digluconato de clorexidina em cárie radicular. Nesse estudo, afirmaram que o digluconato de clorexidina tem sido estudada por mais de 30 anos como um agente antimicrobiano. Quando administrada em baixas concentrações, o digluconato de clorexidina age bacteriostaticamente; em concentrações mais elevadas, funciona como bactericida, abrangendo bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e leveduras.

Raad et al.⁴³ (2011), constataram que cateteres com adição de digluconato de clorexidina, foram efetivos contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. glabrata*. Além de inibir completamente a colonização dos microrganismos s testados, seu efeito foi mais prolongado comparado aos outros tipos de cateteres utilizados no estudo.

2.4 Agentes antimicrobianos naturais: Própolis

Buscando novos métodos de desinfecção, os desinfetantes naturais vêm sendo bastante aceitos na comunidade científica, pois são de fácil acesso pela população, tem baixo custo e tem sido utilizado na medicina há muito tempo. A própolis é um material resinoso complexo produzido por abelhas de exsudatos vegetais, cera de abelha, e secreções de abelhas e é responsável pela segurança de favos de mel, especialmente contra microrganismos (Castaldo, Capasso⁹ em 2002).

Castaldo, Capasso⁹ (2002) afirmaram que a própolis é um dos poucos produtos naturais que tem mantido a sua popularidade durante um longo período de tempo. As moléculas farmacologicamente ativas desta substância são os flavonoides e ácidos fenólicos e seus ésteres. Esses componentes têm múltiplos efeitos sobre bactérias, fungos e vírus. Também afirmaram que preparações de própolis possuem atividade antimicrobiana in vitro principalmente contra bactérias gram-positivas (*Estafilococos* e *Streptococci spp.*) e gram-negativas (*E. coli*, *K. Pneumoniae*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*), *Helicobacter pylori*, protozoários (*T. cruzi*), fungos (*C. albicans*) e vírus (HIV, herpes vírus ou vírus da gripe).

Azevedo et al.⁶ (1999), avaliaram 50 indivíduos com o objetivo de isolar e identificar leveduras na cavidade bucal, e determinar a capacidade antimicrobiana de alguns produtos encontrados no comércio como a própolis (Apis-Flora) e Periogard (Colgate), frente às cepas isoladas. A maioria das cepas testadas (95,7%) foi sensível aos antissépticos, sendo que a própolis apresentou uma atividade antimicrobiana igual a 1:20 para (77,1%) e, o Periogard (60%) cepas de nichos saudáveis; semelhante ao obtido com cepas de lesões bucais. Resultados diferentes ocorreram, principalmente, entre espécies diferentes. Os resultados indicam a possibilidade de se empregar os antissépticos com própolis e Periogard (clorexidina), na prevenção e na terapêutica da candidose bucal.

Ota et al.³⁹(2000) avaliaram a atividade antifúngica da própolis em ensaios de sensibilidade em 80 estirpes de leveduras do gênero *Candida*. No estudo *in vitro*, comprovou-se uma clara atividade antifúngica na seguinte ordem de sensibilidade: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*. No estudo *in vivo* com pacientes que faziam uso de próteses totais e apresentavam sintomas de estomatite, o grupo experimental mostrou redução significativa no número de leveduras de *Candida* na saliva. Estes pacientes utilizaram uma solução hidroalcoólica de própolis (6%) para bochecho duas vezes ao dia, por duas semanas. Os pacientes do grupo controle, que fizeram uso de uma solução hidroalcoólica sem própolis, não mostraram redução no número de leveduras durante o experimento.

Koo et al.²⁵ (2000) analisaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana, a inibição da aderência de estreptococos do grupo mutans e inibição da formação de glucano insolúvel em água por extratos de arnica (10%, w/v) e de própolis (10%, w/v) de Minas Gerais. Estes foram comparados com os grupos controle. Os seguintes microrganismos foram testados: *S. Mutans* (de duas linhagens diferentes), *C. Albicans*, *S. Aureus*, *E. Faecalis*, *S. Sobrinus*, *S. Sanguis*, *S. Cricetus*, *A. Naeslundii*, *A. Viscosus*, *P. Gingivalis*, *P. Endodontalis* e *P. Denticola*. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de difusão em Ágar e o halo de inibição do crescimento foi mensurado. O extrato de própolis inibiu significativamente todos os microrganismos testados ($p < 0,05$), mostrando maior zona de inibição para *Actinomyces* ssp. Aderência celular e formação de glicano insolúvel em água foram quase completamente inibidas pelo extrato de própolis. O extrato de arnica foi apenas ligeiramente ativo nestas três condições.

O ensaio de Sforcin et al.⁴⁸ (2000) foi realizado com o objetivo de observar in vitro a atividade antimicrobiana da própolis, coletada durante as quatro estações, em cepas bacterianas isoladas de infecções humanas. O método utilizado foi difusão do extrato etanólico de própolis em Agar, com concentrações variando de 0,4 a 14% (% v: v). Verificou-se que o crescimento de bactérias gram-positivas é inibido em baixas concentrações de própolis (0,4%), enquanto que bactérias gram-negativas são sensíveis a altas concentrações de própolis (de 4,5 a 8%). Concluiu-se que, após incubação com própolis, houve uma ação antimicrobiana eficiente, principalmente para bactérias gram-positivas.

Fernandes Júnior et al.¹⁸ (2006), relataram que as propriedades antimicrobianas da própolis são amplamente divulgadas em muitos estudos, sendo destacada sua ação sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida sp* e sobre inúmeros outros microrganismos. A ação antimicrobiana de própolis obtidas em três regiões do Brasil foi investigada sobre linhagens isoladas de infecções clínicas humanas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). Foram preparados extratos alcoólicos de própolis (EAP) e determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os resultados mostram maior sensibilidade das bactérias Gram positivas e levedura em relação às Gram negativas, de acordo com a região. Os autores concluíram que, para os microrganismos testados e amostras de própolis testadas, há diferenças na atividade antimicrobiana em função do local de produção e foi explicado pela diferença de composição química da própolis.

Sperança et al.⁵² (2007), analisaram a ação antimicrobiana do extrato alcoólico de própolis, em diferentes concentrações, contra bactérias periodonto patogênicas através de testes in vitro. Com os resultados encontrados foi possível observar que o extrato, em todas as concentrações testadas, apresentou inibição bacteriana. As soluções utilizadas foram de 30%, 20%, 10% e 5%, que na condição de anaerobiose facultativa apresentaram, respectivamente, valores médios de halo de inibição de 16,20 mm, 15,41 mm, 15,11 mm e 13,07 mm Na condição de microaerofilia os valores médios foram de 16,12mm, 15,03mm, 14,10mm e 13,20mm, respectivamente. Este estudo ressalva a importância de dar continuidade aos estudos com própolis, pois foi observada ação antimicrobiana até mesmo em baixas concentrações, com base nas condições

experimentais da pesquisa. Como não houve diferença no potencial de inibição entre as concentrações é satisfatório utilizar concentrações menores a fim de evitarmos a resistência bacteriana.

Umthong et al.⁵⁶ (2009), utilizando extrato etanoico de própolis e extrato de água de própolis, analisaram a ação antimicrobiana desses dois produtos em 4 tipos de bactérias, onde concluiu que o extrato de água tem maior eficácia, no entanto as duas soluções tiveram a mesma ordem de sensibilidade entre as bactérias, que foi *S. aureus*>*E. coli*>*C. albicans*>*A. niger*, a ordem está da bactéria mais sensível para a menos sensível ao extrato.

Popova et al.⁴² (2009), isolaram vários compostos do própolis cretense, dentre esses vários compostos, sete foram isolados pela primeira vez como componentes do própolis. A atividade antimicrobiana dos compostos foi testada contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e contra alguns fungos patogênicos, onde foram obtidos como resultados que os compostos contêm uma ampla ação antimicrobiana.

Madhubala et al.³², em 2011, tiveram como objetivo comparar a atividade antimicrobiana de um extrato etanoico de própolis, hidróxido de cálcio e da mistura triantibiótica (TAM), contra a bactéria *E. Faecalis* em canais radiculares infectados. Tais amostras foram divididas em cinco. Cada grupo foi então dedicado a um tipo de medicamento intracanal, que foram o hidróxido de cálcio (grupo 1), TAM (grupo 2), própolis etanólico (grupo 3), etanol (grupo 4), e solução salina como sendo o grupo controle (grupo V). No 2º dia de análise a própolis teve 100% de redução das colônias seguido do TAM, que nos 1º, 2º e 3º dia teve 82,5%, 92,2%, e 98,4% de redução respectivamente, já o hidróxido de cálcio mostrou um aumento gradual de redução onde ao 7º dia alcançou o valor de 59,4%. Pode-se concluir com que a própolis foi mais eficaz do que o TAM contra *E. Faecalis* nos primeiros dias, no entanto o estudo também mostra que ambos no 7º dia de análise obtiveram o mesmo valor de redução de microrganismos.

Dodwad, Kukreja¹² (2011), utilizando 30 indivíduos, divididos em três grupos de dez, promoveram bochechos com três substâncias diferentes, o digluconato de clorexidina 0,2%, uma solução salina e uma solução de própolis. Os índices de placa bacteriana dos indivíduos foram avaliados no início da pesquisa e após cinco dias. Os resultados

mostraram diminuição da placa nos três grupos, mostrando que a própolis pode ser uma alternativa para soluções químicas de bochecho, como o digluconato de clorexidina.

2.5 Agentes antimicrobianos naturais: Óleo de Melaleuca

O óleo da árvore do chá (tea tree oil ou TTO), também é outro produto natural de origem australiano, muito usado pelos aborígenes, com ações, segundo estudos recentes, antimicrobianas.

Segundo Cox et al.¹⁰⁻¹¹, em 2000 e 2001, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil – TTO) apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana. Seu modo de ação contra a bactéria gram negativa *Escherichia coli*, contra a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* e contra a levedura *Candida albicans* foi investigada por vários métodos diferentes. Em seu estudo foi comprovado que a atividade antimicrobiana do TTO é devido a sua capacidade de perturbar a barreira de permeabilidade da membrana de estruturas microbianas. Este modo de ação é o mesmo para *E. Coli*, *S. Aureus* e *C. Albicans*, e é semelhante a outros desinfetantes, como o digluconato de clorexidina.

Messagera et al.³⁵(2005) testaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de tea tree oil (TTO). Estas formulações foram testadas contra *Staphylococcus aureus*, *Actinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A eficácia de TTO pareceu ser dependente da formulação e da concentração testadas, da concentração das substâncias que foram incorporadas e, por último, do microrganismo testado. Neste estudo, os autores concluíram que as formulações testadas, de uma forma geral, alcançaram elevada redução no número de células bacterianas.

Segundo Park et al.⁴⁰ (2007), uma concentração de 50% de óleo de melaleuca, a MRSA se torna susceptível a esse óleo numa proporção similar ao da vancomicina. A concentração de 100% de óleo de Melaleuca foi a que apresentou resultados mais satisfatórios sobre as colônias de MRSA, demonstrando que a ação é dependente da concentração.

Edris¹⁵ (2007) avaliou a atividade antibacteriana de TTO puro e de alguns produtos para lavar a pele contendo TTO, contra *S. aureus*, *A.baumannii*, *E.coli* e *P. aeruginosa*. Todas as formulações mostraram atividade antibacteriana, mas a eficácia do TTO puro pareceu ser dependente da formulação e concentração testadas. As formulações foram encontradas para serem seguras, eficazes, e bem toleradas. O TTO demonstrou um tempo de matança relativamente curto (menos de 60 minutos) para os organismos multirresistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Segundo Kwiecinski et al.²⁷ (2009), TTO é um óleo essencial obtido a partir da *Melaleuca alternifolia*, e ganhou a atenção de cientistas, médicos e consumidores por causa da sua ampla atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Neste estudo, verificaram se o TTO é eficaz contra *Staphylococcus aureus* em biofilmes e como a atividade do TTO é afetada pela fase de crescimento do *S. aureus*. Foi mostrado que um tratamento de 1 hora com TTO 5% erradica biofilmes. Estes dados mostram que o TTO eficientemente mata *S. aureus*, tanto em suspensão e em biofilmes.

No estudo de Sánchez-Gonzales et al.⁴⁴ (2011), antimicrobianos foram preparados através da incorporação de diferentes concentrações de bergamota (BO), limão (LO), óleo da árvore de chá (TTO) e óleos essenciais (OE) em quitosana (CH) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Sua eficácia antibacteriana foi testada contra *L. monocytogenes*, *E. Coli* e *S. aureus*, na temperatura de 10° C durante um período de armazenamento de 12 dias. Em todas as matrizes de filmes, o TTO exibiu a maior atividade antimicrobiana. Uma inibição completa do crescimento microbiano foi observada para CH ou TTO para *E. Coli*, TTO para *L. Monocytogenes* e -BO para *S. aureus*.

No estudo de Low et al.³⁰ (2011), TTO e íons prata (Ag⁺) foram adicionados, isoladamente e em combinação, para culturas em suspensão de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. O tratamento destas culturas com combinação de TTO e Ag⁺ em concentrações sub-letais mínimas resultou em uma perda de viabilidade em comparação com o tratamento individual desses agentes. A ordem de sensibilidade foi: *P. Aeruginosa* > *S. Aureus* > *C. Albicans*. Estes resultados indicam que a combinação desses agentes antimicrobianos pode ser útil na diminuição da concentração de agentes antimicrobianos necessários para atingir uma redução efetiva de microrganismos patogênicos oportunistas, minimizando também o rápido desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos na forma individual.

Edmondson et al.¹⁴ (2011), sabendo das propriedades do óleo da árvore do chá, foi proposto avaliar neste estudo sua ação antimicrobiana e cicatrizante durante um procedimento de limpeza de feridas, agudas e crônicas de etiologias mistas, contendo MRSA. Dezenove participantes com suspeitas de ferida contendo MRSA participaram da pesquisa. Os restantes foram tratados com o óleo de Melaleuca, miscível em água, numa solução de 3,3%. O produto foi aplicado durante a limpeza das feridas nas trocas de curativo. Após o tratamento, 8 das 11 feridas começaram a se curar e diminuir de tamanho, no entanto nenhum voluntário era MRSA negativo no final do tratamento.

3 Proposição

No presente estudo foi proposto avaliar o efeito de substâncias antimicrobianas e determinadas propriedades mecânicas, físicas e morfológicas de um gesso odontológico tipo IV após a incorporação de diferentes agentes desinfetantes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Análise antimicrobiana

4.1.1 GRUPOS DE AMOSTRAS

Para o gesso, as amostras foram separadas em cinco grupos de acordo com o agente desinfetante utilizado para substituir a água destilada e agrupadas igualmente para o microrganismo estudado, da seguinte forma:

Grupo 1: gesso manipulado com água destilada esterilizada;

Grupo 2: gesso manipulado com digluconato de clorexidina 2% (CHX);

Grupo 3: gesso manipulado com óleo de *Melaleuca alternifolia* á 20% (Arista Indus, USA), e acréscimo de emulsificador DMSO 0.4% (dimetil sulfóxido, SIGMA, USA); (TTO)

Grupo 4: gesso com incorporação de extrato seco de própolis 4,4% (Farmácia Reativa, Araraquara, SP, Brasil).

Grupo 5: gesso manipulado com extrato hidroalcoólico de própolis á 14% (Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

O grupo 1 foi considerado como controle negativo, tendo o objetivo de medir o máximo de contaminação possível para cada microrganismo. O DMSO é comumente usado nas pesquisas para facilitar a dispersão dos óleos essenciais através do meio de cultura.

Para os discos de papel (controle negativo das substâncias) as amostras também foram divididas em grupos de acordo com o agente desinfetante sozinho e agrupadas igualmente para o microrganismo estudado da seguinte forma:

Grupo 1: discos de papel embebidos em água destilada(controle)

Grupo 2: discos de papel embebidos em digluconato de clorexidina á 2%(CHX);

Grupo 3: discos de papel embebidos em óleo de *Melaleuca alternifolia* 20% (Arista Indus, USA), e acréscimo de emulsificador DMSO 0.4% (SIGMA USA); (TTO)

Grupo 4: discos de papel embebidos em extrato seco de própolis á 4,4% (Farmácia Reativa, Araraquara, SP, Brasil);

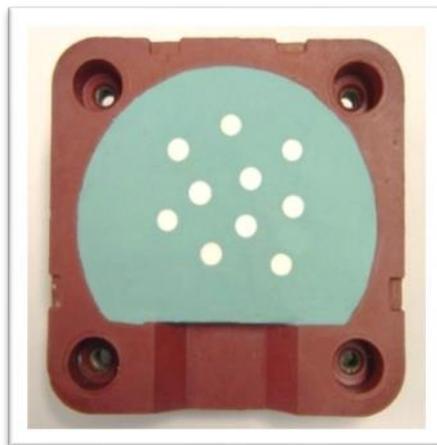
Grupo 5: discos de papel embebidos em extrato hidroalcoólico de própolis á 14% (Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Para cada grupo foram confeccionadas 24 amostras, sendo 8 amostras para cada período de análise (1 hora, 24 horas e 7 dias).

4.1.2 CONFECÇÃO DOS MOLDES

Para a confecção dos moldes, matrizes metálicas foram moldadas com silicone por adição em mufla (Clássico Artigos Odontológicos Ltda.), permitindo a obtenção de moldes padronizados, de acordo com (Figura 1).

Figura 1- Confecção moldes padronizados, Araraquara, 2012.



Para evitar a expansão do gesso, a contra-mufla, foi preenchida com gesso pedra especial tipo IV (FujiRock EP, GC Europe, Leuven, Belgium.), manipulado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma placa de vidro (60 mm x 40 mm x 3 mm de espessura) foi acomodada antes de sua total cristalização. Sobre essa placa, matrizes metálicas de aço inox nas dimensões de 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram fixadas. A mufla foi então preenchida até sua borda por silicona por adição (Flexitime® – Heraeus-Kulzer GmbH&Co. KG – Alemanha) manipulada segundo as instruções do fabricante, sendo logo em seguida fechada. Após a completa reação de polimerização da silicona, a mufla foi aberta e as matrizes metálicas foram removidas.

Cada molde de silicona foi utilizado apenas uma vez, sendo que, após sua utilização, novos moldes foram feitos, com o objetivo de evitar possíveis distorções e contaminação dos corpos-de-prova.

4.1.3 CONFECÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA

O gesso pedra tipo IV (Fuji Rock EP) foi pesado em uma balança de precisão digital modelo BL 210 -S (Sartorius AG, Goettingen, Germany), em porções de 30g.

Foram dispensados 6 ml de solução desinfetante ou de água destilada estéril no

interior da cuba metálica de espatulação e posteriormente 30 g de gesso foram adicionadas, o gesso então foi espatulado em um espatulador a vácuo Turbomix/EDG (EDG Equipamentos e Controles, São Carlos, Brasil) durante 60 segundos a uma rotação de 450 r.p.m., conforme recomendações do fabricante.

Em seguida, a mufla foi posicionada sobre um vibrador para gesso(EDG Equipamentos e Controles, São Carlos, Brasil) e pequenas proporções de gesso foram introduzidas nos moldes, evitando-se a inclusão de bolhas de ar, sendo posteriormente fechada e os parafusos metálicos apertados para limitar a expansão de presa e para também garantir uma superfície lisa e uniforme dos corpos-de-prova.

Após 1 hora, os corpos-de-prova foram removidos dos moldes de silicona e, como o teste microbiológico foi realizado em triplicata, os corpos-de-prova foram divididas em três grupos: um terço foi utilizado imediatamente no teste de difusão em ágar e os outros dois terços foram armazenados à temperatura ambiente, em recipientes autoclavados, para serem utilizados posteriormente após 24 horas e 7 dias.

Como controle das substâncias foram confeccionados corpos-de-prova de discos de papel filtro com 5 mm de diâmetro embebidos com 20µl,e armazenados em embalagens próprias e esterilizados a 121°C por 20 minutos em autoclave antes da incorporação das substâncias.

4.1.4 PREPARO DAS SUSPENSÕES MICROBIANAS

Primeiramente foi preparado o meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) (Acumedia-Baltimore, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo 5mL adicionados a tubos de ensaio. Cepas dos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Candida albicans* (ATCC 10231) foram inoculadas, separadamente, nos tubos contendo meio de cultura TSB e incubadas a 37°C em estufa (Marconi Eq. Lab. Ltda.,Piracicaba, SP, Brasil) por 24 horas.

Após o período de incubação, os tubos de ensaio foram centrifugados e o sobrenadante eliminado. Posteriormente, 5 ml de solução salina (0,0085 g/L) foram adicionados aos tubos e novamente centrifugados. O sobrenadante dessa última centrifugação foi eliminado e mais 5 ml da mesma solução salina foram adicionados. Os tubos de ensaio foram agitados em agitador de tubos (modelo MA 162 – Marconi, Eq. Lab.

Ltda.Piracicaba,SP,Brasil), e o grau de turvação foi comparado com padrões da escala de McFarland, a fim de se obter alíquotas das suspensões padronizadas com concentrações de aproximadamente 15×10^8 ufc/mL de cada microrganismo, correspondente ao tubo n°. 5.

4.1.5 PREPARO DAS PLACAS DE PETRI

Para cada microrganismo, foi utilizado um meio de cultura específico: Agar Saboraud Dextrose (Acumedia-Baltimore, MA, EUA) para *C. albicans*, Agar Mannitol Salt (Acumedia-Baltimore, MA, EUA) para *S. aureus*, Agar Mueller Hinton (Acumedia-Baltimore, MA, EUA) para *E. Coli* e Tryptic Soy Agar (Acumedia-Baltimore, MA, EUA) para *B. subtilis*.

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Logo em seguida, 60 ml de cada meio de cultura foram dispersos, homogeneamente, em placas de Petri esterilizadas com 15 mm de diâmetro, mantendo uma espessura de 4 mm.

Após o esfriamento e a solidificação dos meios de cultura, as placas de Petri foram embrulhadas em papel e armazenadas em geladeira para posterior utilização.

4.1.6 INOCULAÇÃO DO MEIO DE CULTURA, INSERÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA E INCUBAÇÃO.

Uma alíquota de 50 µL da suspensão microbiana foi transferida para a placa de Petri e espalhada, com auxílio de uma alça de Drigalsky estéril, igualmente por toda a superfície do meio de cultura, para que haja crescimento uniforme do microrganismo.

Em seguida, os corpos-de-prova, um de cada grupo de amostras, foram inseridos com auxílio de uma pinça estéril em regiões equidistantes e previamente identificadas através de um gabarito escrito sob a placa. Antes de serem inseridos na placa de Petri, todos os discos de papel foram embebidos com 20µL das soluções desinfetantes, e armazenados. De forma que em cada momento do teste as substâncias haviam sido manipuladas e armazenadas a 1 h, 24h e 7dias(momento 1, 2 e 3)

Em seguida, a placa de Petri foi fechada e incubada em uma estufa bacteriológica (Marconi) à temperatura de 37°C durante 24 horas.

Todos esses procedimentos para o teste de difusão em ágar foram igualmente

realizados para cada microrganismo.

4.1.7 TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR

O teste de difusão em Agar constitui um método realizado em placa de Petri contendo meio de cultura sólido, sobre o qual se inocula (semeia-se) uniformemente, em toda a superfície, uma quantidade conhecida do microrganismo indicador (Estrela et al.¹⁶, 2003).

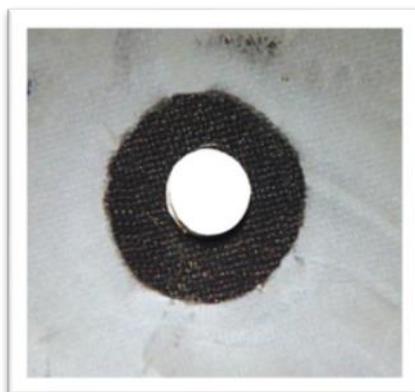
Os microrganismos utilizados foram duas bactérias gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), uma bactéria gram negativa (*Escherichia coli*) e um fungo (*Candida albicans*). Esses microrganismos foram selecionados por terem sido utilizados em estudos prévios que avaliaram a efetividade de procedimentos de desinfecção na Odontologia^{22, 25, 34, 48,54}.

4.1.8 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o período de incubação, foi observado se o crescimento dos microrganismos sobre os meios de cultura foi uniforme, pois caso houvesse o crescimento de colônias isoladas, a placa foi desprezada e o teste repetido.

Posteriormente, com um paquímetro digital (Electronic Digital Calipers – Starret, USA – graduação de 0,01 mm) e uma fonte de luz refletida, a mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor dos corpos-de-prova foi realizada, utilizando como valor para análise a média de duas medidas perpendiculares entre si, como se pode visualizar na Figura 2.

Figura 2- Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor dos corpos-de-prova, Araraquara, 2012.



O teste de difusão em Ágar foi realizado em triplicata (tempo de análise de 1 hora,

24 horas e sete dias), sendo adotado o valor médio do halo de inibição, com o objetivo de obter valores mais precisos e confiáveis.

4.2 Análise mecânica, física e morfológica

4.2.1 GRUPOS DE AMOSTRAS:

As amostras foram separadas em cinco grupos de acordo com o agente desinfetante utilizado para substituir a água destilada, da seguinte forma:

Grupo 1: gesso manipulado com água destilada esterilizada;

Grupo 2: gesso manipulado com digluconato de clorexidina 2%;

Grupo 3: gesso manipulado com óleo de *Melaleuca alternifolia* 20% (Arista Indus, USA), e acréscimo de emulsificador DMSO 0.4% (SIGMA USA);

Grupo 4: gesso com incorporação de extrato seco de própolis 4,4% (Farmácia Reativa, Araraquara, SP, Brasil).

Grupo 5: gesso manipulado com extrato hidroalcoólico de própolis 14% (Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

O DMSO é comumente usado nas pesquisas para facilitar a manipulação com água dos óleos essenciais.

4.2.2. ANÁLISE DO TEMPO DE PRESA:

O tempo de presa foi determinado através da metodologia estabelecida pela especificação n° 25 da A.D. A⁴. No seu requisito 4.3.5.2, onde se recomenda a utilização de um aparelho de Vicat. A análise do tempo de presa foi efetuada através da penetração de uma agulha metálica de 1mm de diâmetro e 50mm de comprimento, acoplada a uma vareta de alumínio verticalmente móvel.

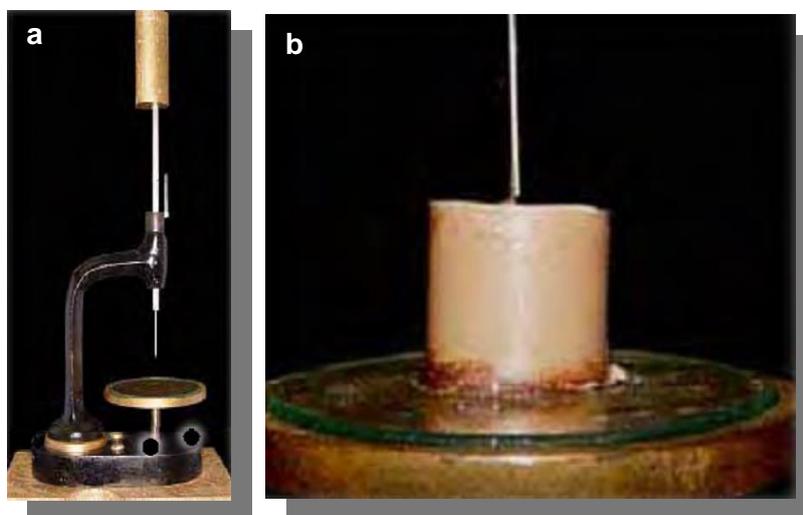
Com uma balança modelo BL 210-S (Sartorius AG, Goettingen, Germany), com precisão de 0,001 grama, foram pesados 35 g de gesso (Fuji Rock EP, GC Europe, Leuven, Belgium), para cada teste. De acordo com a proporção recomendada pelo fabricante (100 ml de líquido/ 20g de gesso), para cada amostra foram medidas com uma pipeta 6 ml de líquido (solução desinfetante ou água). O gesso então foi espatulado em um espatulador a vácuo Turbomix/ EDG (EDG Equipamentos e Controles, São Carlos, Brasil) durante 60 segundos a uma rotação de 450 r.p.m.

Um anel de P.V. C com diâmetro interno e altura de 25 mm foi fixado com cera utilidade em uma placa de vidro circular e posicionado na base do aparelho Vicat. A

massa do gesso foi então vertida no anel com a agulha do aparelho travada a 0,5 mm de distância da superfície do gesso, sendo posteriormente liberada, permitindo assim a completa penetração da mesma. Após isso, foram realizadas penetrações sequenciais até que a agulha deixou de penetrar na massa(Figura 3)

O tempo depreendido entre o início da mistura até o ponto em que a agulha deixa de penetrar foi medido com um cronômetro, para que obtenha o tempo de presa Vicat, de acordo com as normas da A.D.A.⁴.

Figura 3 - a) Aparelho Vicat. b) Base do aparelho Vicat com anel de PVC. Araraquara, 2012,



4.2.3. ANÁLISE DA REPRODUÇÃO DE DETALHES:

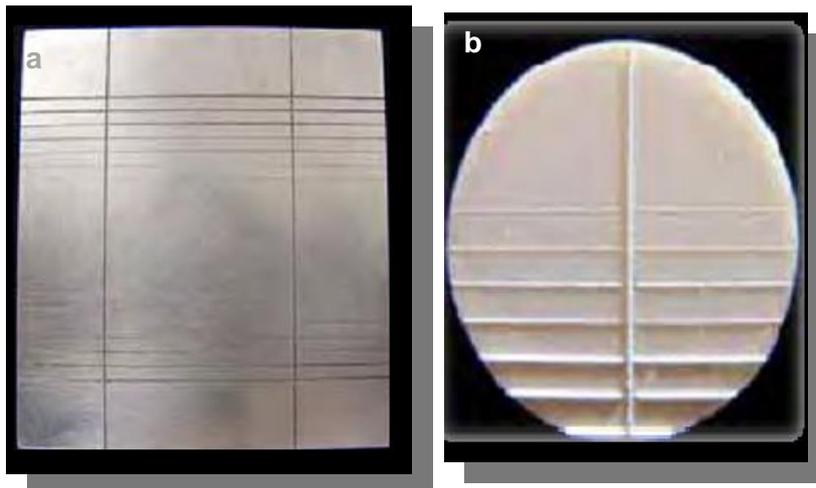
Para a análise da reprodução de detalhes foi utilizada uma placa de aço inoxidável, com entalhes de diferentes profundidades que variam de 0,025 a 0,300 mm, respeitando as normas estabelecidas pela especificação nº 25 da A.D.A.⁴ Sobre a placa metálica, foi fixado um anel metálico com 30 mm de diâmetro e 15 mm de altura, de maneira que a linha de 0,050 mm de profundidade permaneça centralizada no interior do anel(Figura 3a).

Após o gesso ser espatulado a vácuo com a solução de cada amostra, foi vertido sobre vibração no interior do anel cilíndrico previamente vaselinado. Após 2 horas, as amostras foram removidas do anel metálico e a superfície analisada em lupa estereoscópica sob aumento de 10X(Figura 3 b).

De acordo com a normatização da A.D.A.⁴, na análise da superfície da amostra, uma reprodução de detalhes pode ser considerada satisfatória quando houver a cópia da

linha de 0,050 mm de forma contínua em todo o diâmetro interno do anel. Tal linha corresponde à linha 4 no presente estudo (Figura 4). Para a análise de cada linha foi utilizado escalas (1-copiou toda extensão; 2-copiou com pequena falha; 3-copiou com grandes falhas).

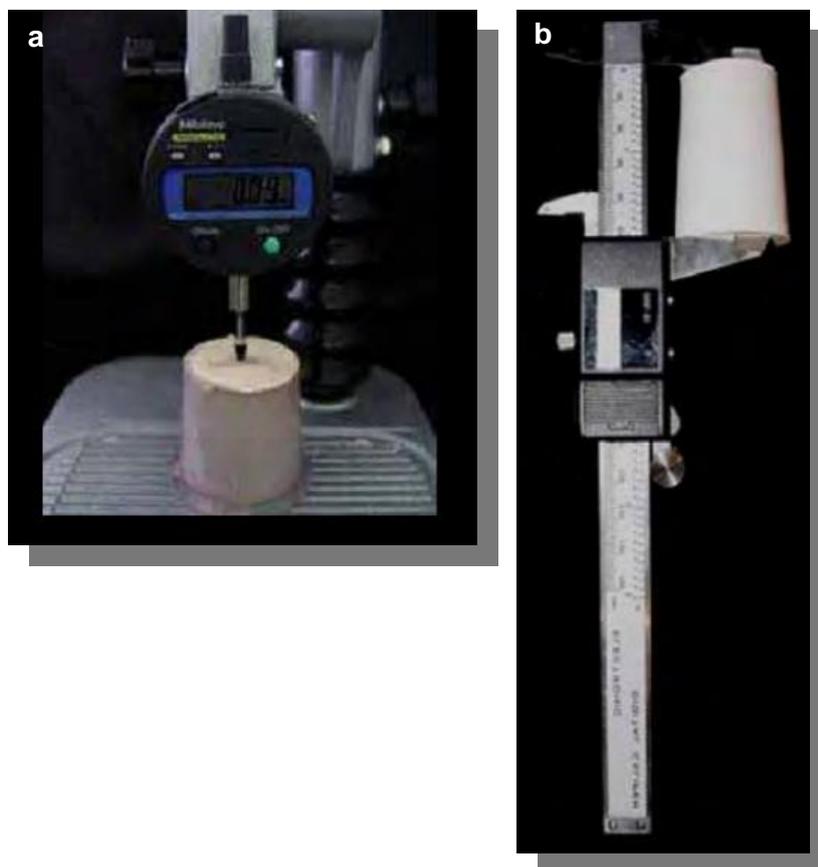
Figura 4 - a) placa de aço inoxidável, com entalhes de diferentes profundidades. b) Amostra com copia dos entalhes, Araraquara, 2012.



4.2.4. MENSURAÇÃO DA ALTERAÇÃO DIMENSIONAL LINEAR:

Na investigação da alteração dimensional do gesso foi utilizado um dispositivo descrito por Ferreira¹⁹, que consiste em um relógio comparador digital Mitutoyo Absolute “ABSOLUTE” ID-C (Mitutoyo Suzano SP, Brasil) com precisão centesimal fixado a uma base. Então, um anel de borracha foi fixado com cola à base de P.V.A. sobre uma placa de vidro utilizado para não restringir a expansão do gesso (Figura 5). Foram proporcionados 110 gramas de gesso com 22 ml de líquido e espatulado a vácuo, respeitando as recomendações do fabricante (100 ml/ 20g de gesso). Após a espatulação a massa foi vertida no anel de borracha e o tempo de 10 minutos foi aguardado para a colocação de uma lamínula de vidro sobre o gesso e em seguida a amostra foi posicionada para a medição do relógio comparador. O conjunto pode ser visualizado pela Figura 5 a e b.

Figura 5 - a) Relógio comparador digital. b) Mensuração do corpo-de-prova com paquímetro digital. Araraquara, 2012.



Após duas horas, o corpo-de-prova foi removido do interior de anel de borracha e medido com um paquímetro digital (Starret – graduação de 0,01 mm), obtendo-se assim o seu comprimento final. O valor do comprimento final (L_f) do corpo-de-prova, juntamente com a alteração ocorrida (ΔL) após duas horas em mm, permite calcular o comprimento inicial (L_0) e com isso, a alteração dimensional linear em porcentagem (%ADL), através das seguintes fórmulas:

$$L_0 = L_f - \Delta L$$

$$\% ADL = \Delta L / L_0 \times 100$$

4.2.5. RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO:

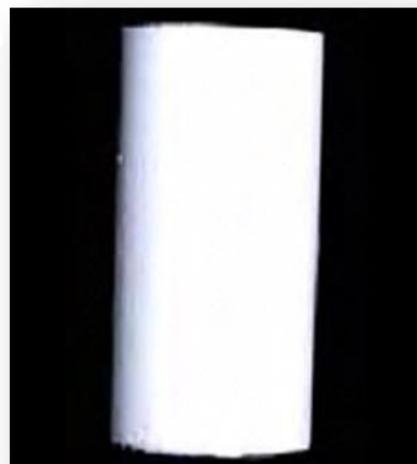
Para a obtenção dos corpos-de-prova do ensaio de resistência à compressão foram confeccionadas matrizes cilíndricas metálicas em latão, bipartidas, com um

diâmetro interno de 20 mm e comprimento de 40 mm, conforme especificado na normatização nº 25 da A.D.A.⁴.

As matrizes foram posicionadas sobre uma placa de vidro e fixadas com cera utilidade para evitar o extravasamento. O gesso manipulado na proporção água/pó recomendada pelo fabricante foi vertido no interior das matrizes (Figura 6).

Decorrido o tempo de presa do gesso, os corpos-de-prova foram removidos das matrizes e para determinação da resistência à compressão, foram comprimidos em uma máquina de ensaios mecânicos computadorizada MTS-810 (MTS System Corporation, Minneapolis, USA), com célula de carga de 100 KN, e velocidade constante de 0,5 mm/min(Figura 6). A força foi aplicada até a ruptura dos corpos-de-prova e a resistência à compressão foi determinada pela divisão da carga de ruptura (KN) pela área do espécime (mm²) e expressa em MPa.

Figura 6- a) Matrizes cilíndricas metálicas em latão. b) Corpo-de-prova. Araraquara, 2012.



4.2.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA:

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada na Fundação de Apoio Institucional ao Desenvolvimento Científico (FAI - UFSCar) e a análise foi efetuada a partir de pequenas amostras de 10 gramas de gesso, revestidas em ouro para a realização da MEV. Foram realizadas fotomicrográficas sob os aumentos de 300, 500 e 1000 kx a uma distância média de 15 mm. As imagens foram comparadas visualmente no mesmo aumento em cada grupo e as características na microestrutura do hemihidrato de cálcio analisadas conforme o tamanho, localização e formato.

4.3 METODOLOGIA ESTATÍSTICA:

Todos os dados foram analisados em relação à presença de outliers e quanto aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variáveis (teste de Levene).

Para as variáveis dependentes do tempo de presa, alteração dimensional e resistência à compressão do material foram utilizadas o teste Anova a um critério ($\alpha=0,05$), seguido pelo teste de Tukey para identificar a existência de diferenças significantes entre os cinco grupos de gesso.

Para a variável reprodução de detalhes foi executado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação aos pares (teste de Dunn) para identificar diferenças significantes entre os cinco tipos de gesso ($p \leq 0,05$).

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As fotomicrográficas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 15kV. As amostras foram recobertas com 10nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise.

Foram obtidas as foto micrografias através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 300, 500, 1000 kx e as imagens foram comparadas visualmente no mesmo aumento em cada grupo.

RESULTADO

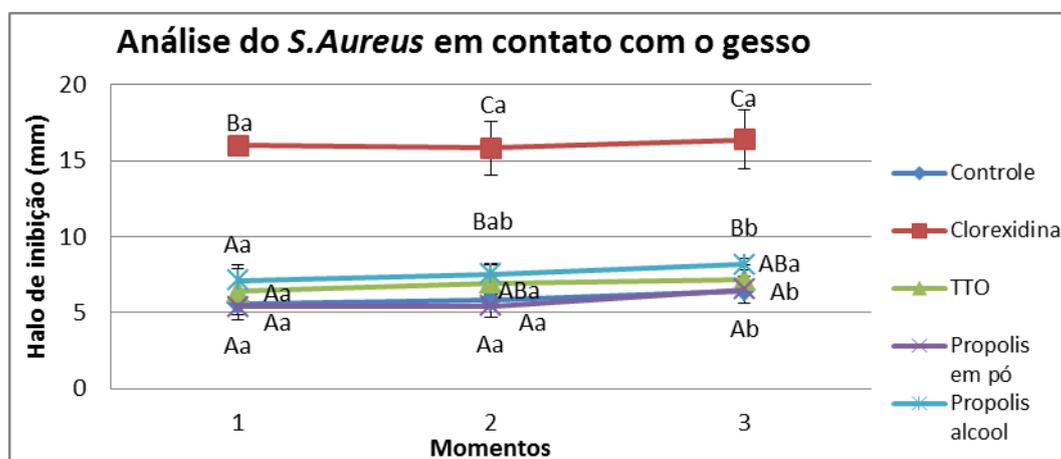
5.1 Efeitos antimicrobianos:

A análise estatística utilizada foi realizada separadamente para cada microrganismo estudado, uma vez que apresentam características celulares e comportamentos diferentes (Tabela A1 e Tabela A2, demonstradas pelos Gráficos 1 à 24).

ANÁLISE COMPARATIVA DO GRUPO DE GESSO EM CADA MOMENTO-

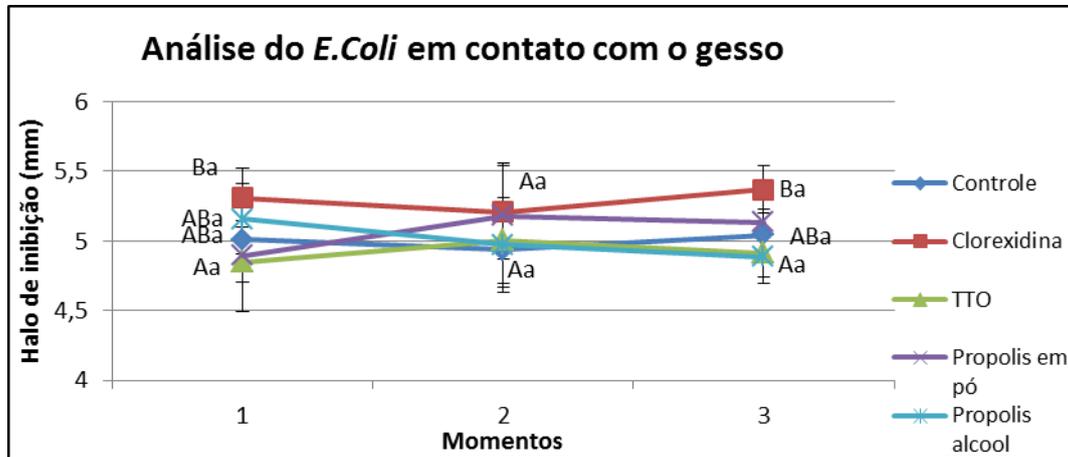
Para todos os Gráficos, letras minúsculas diferentes indicam estatisticamente significante entre os tratamentos e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os momentos para cada tratamento. Seguem nos Anexos os resultados das análises estatísticas para gesso e papel em contato com os microrganismos (Tabela A1)

Gráfico 1- Análise comparativa do grupo de gesso em cada momento para o microrganismo *S. Aureus*.



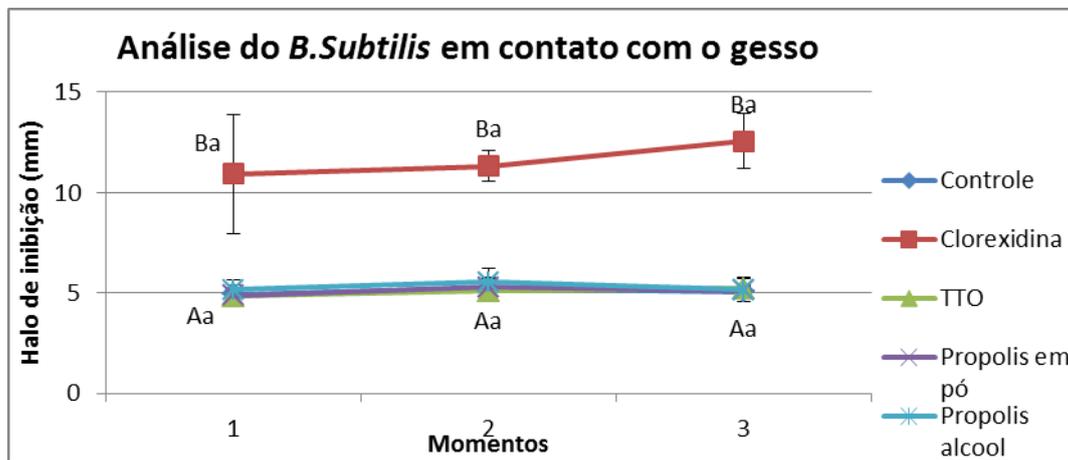
Os valores do Gráfico 1 demonstraram que o microrganismo *S. Aureus* foi mais sensível a adição de CHX ao gesso odontológico, seguido pela adição de extrato de própolis hidroalcolico para o momento 2 e 3. Os demais foram estatisticamente similares ao grupo controle.

Gráfico 2 - Análise comparativa do grupo de gesso em cada momento para o microrganismo *E. Coli*.



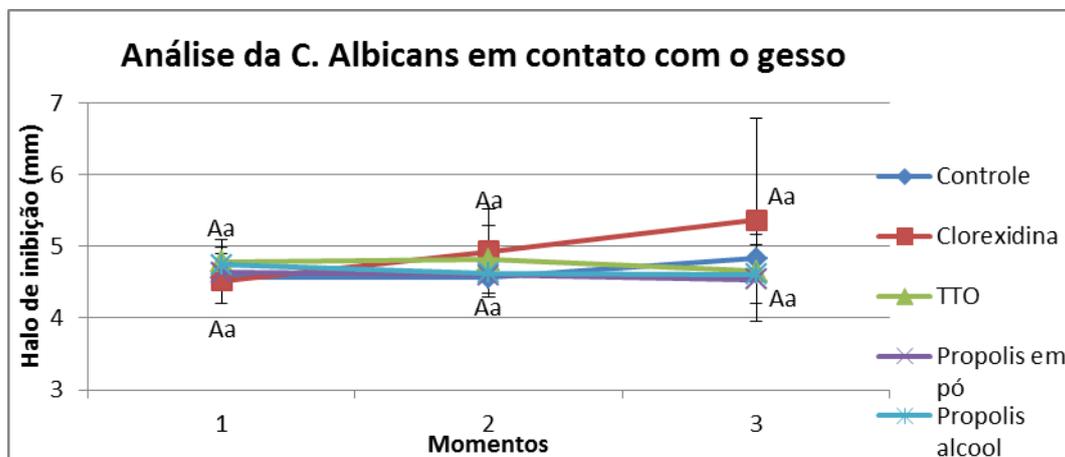
Já o microrganismo *E.Coli* demonstrou no gráfico 2, pouca sensibilidade aos desinfetantes testados, exceto para CHX, nos momentos 1 e 3 .

Gráfico 3 - Análise comparativa do grupo de gesso em cada momento para o microrganismo *B. Subtilis*.



Analisando o Gráfico 3 podemos observar que apenas à CHX mostrou atividade antimicrobiana sobre o microrganismo, em todos os momentos.

Gráfico 4 - Análise comparativa do grupo de gesso em cada momento para o microrganismo *Candida Albicans*



No Gráfico 4, nenhuma das substâncias demonstrou atividade antimicrobiana para todos os momentos.

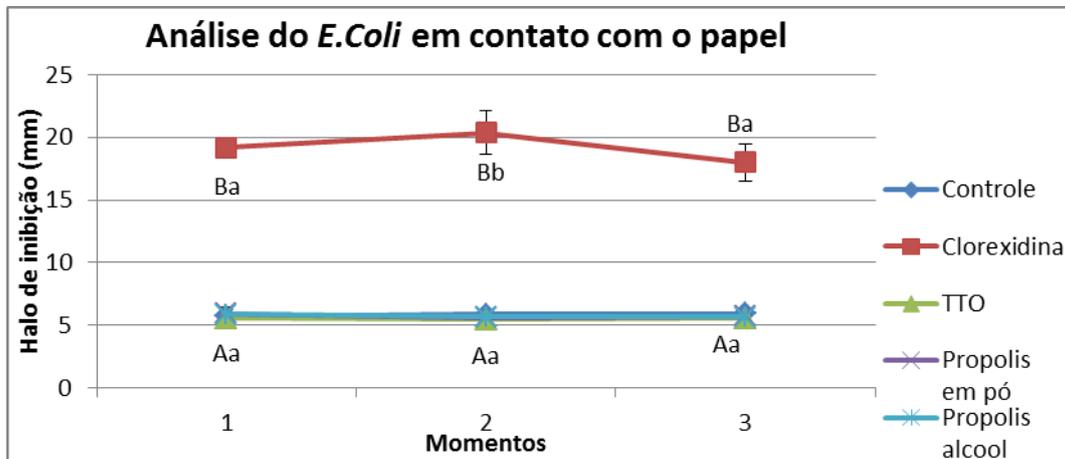
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS DE CONTROLE DA SUBSTÂNCIA EM DISCO DE PAPEL

De acordo com a análise estatística ANOVA ($p \leq 0,05$), foi observado que a incorporação de CHX ao gesso odontológico apresentou maior efeito antimicrobiano para todos os microrganismos exceto para *C. Albicans*. O extrato de própolis hidroalcoólico apresentou efeito antimicrobiano para o período de 24 h e de 7 dias, porém inferior ao efeito da CHX.

Para os grupos de papel filtro embebidos em substâncias, a CHX apresentou efeito antimicrobiano, sem perda de atividade em 7 dias. No grupo com o *S.aureus* a incorporação de extrato hidroalcoólico de própolis foi estatisticamente semelhante ao efeito antimicrobiano da CHX. A incorporação das demais substâncias foi estatisticamente semelhante ao controle.

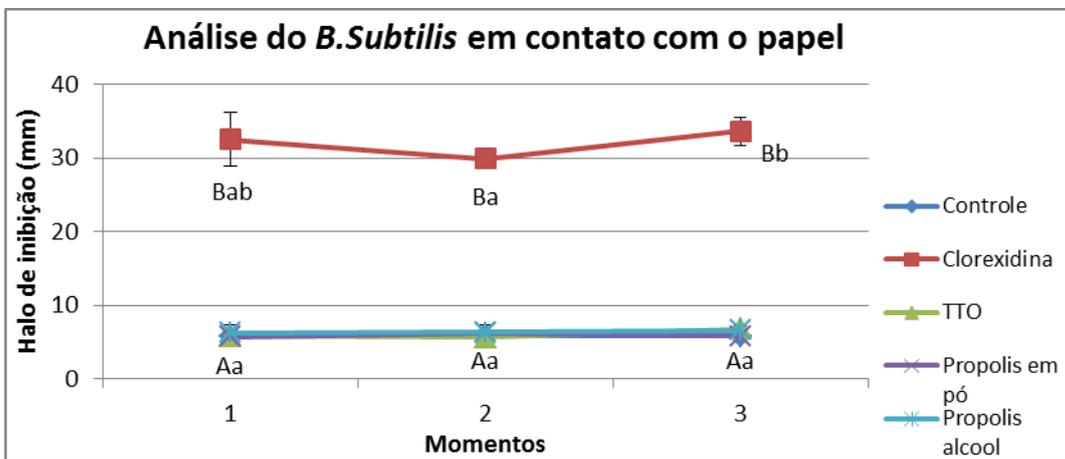
O resultado apresenta-se demonstrado nos Gráficos de acordo com Tabela A2 (Anexo).

Gráfico 5 - Análise comparativa do grupo de papel em cada momento para o microrganismo *E. Coli*.



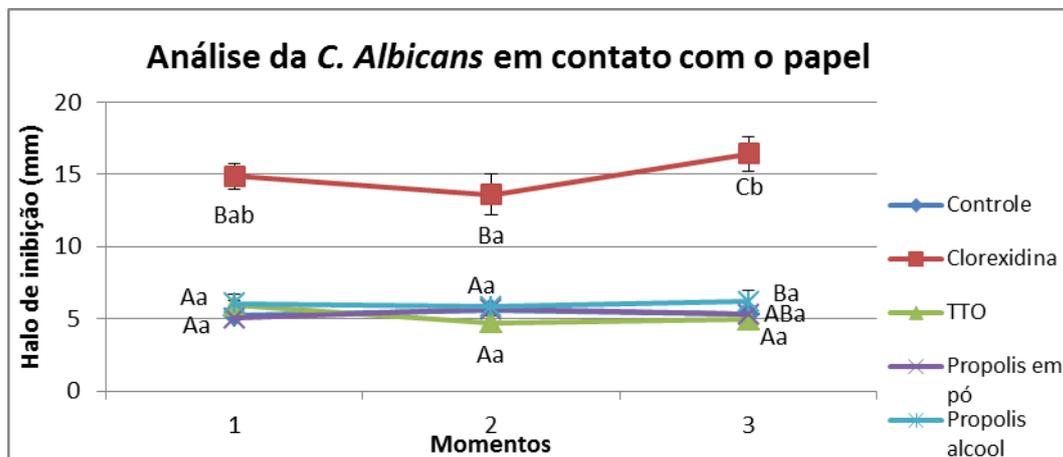
Analisando o Gráfico 5 podemos observar que o microrganismo *E. Coli* demonstrou ter atividade antimicrobiana apenas ao digluconato de clorexidina, para todos os momentos.

Gráfico 6 - Análise comparativa do grupo de papel em cada momento para o microrganismo *B. Subtilis*.



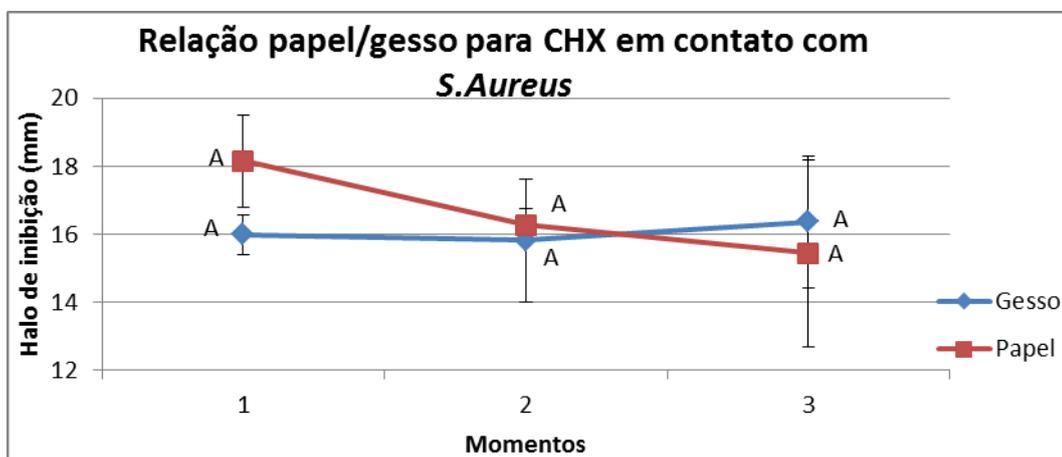
Analisando o Gráfico 6 podemos observar que o microrganismo *B. Subtilis* demonstrou ser estatisticamente sensível apenas ao digluconato de clorexidina, para todos os momentos.

Gráfico 7- Análise comparativa do grupo de papel em cada momento para o microrganismo *Candida Albicans*.



Analisando o Gráfico 7 podemos observar que a digluconato de clorexidina apresentou atividade antimicrobiana contra a *C. Albicans*, para todos os momentos, seguido pelo extrato de própolis hidroalcoólico somente no momento 3.

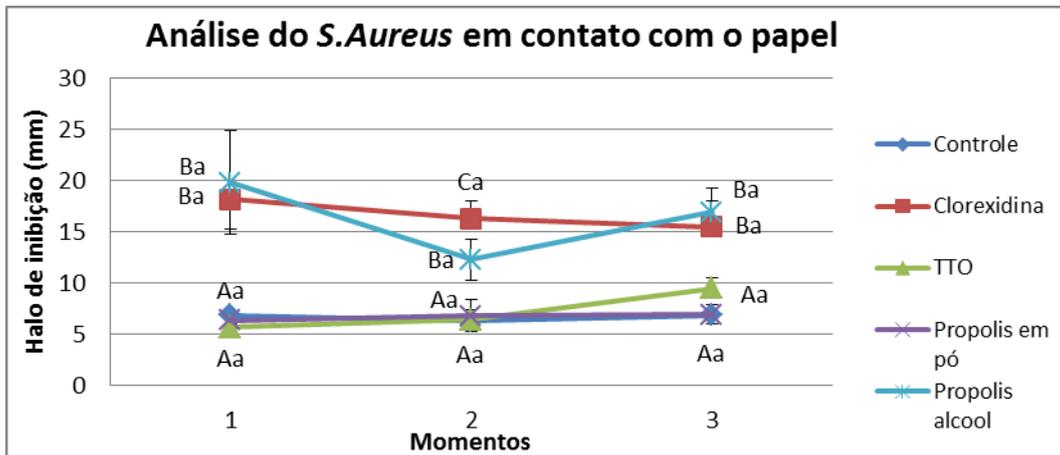
Gráfico 8 - Análise comparativa do grupo de papel com digluconato de clorexidina em cada momento para o microrganismo *S. aureus*



Analisando o Gráfico 8 podemos observar que o digluconato de clorexidina e ao extrato de própolis hidroalcoólico demonstraram atividade antimicrobiana estatisticamente semelhante entre si contra o *S. Aureus*, para todos os momentos, exceto para o momento 2.

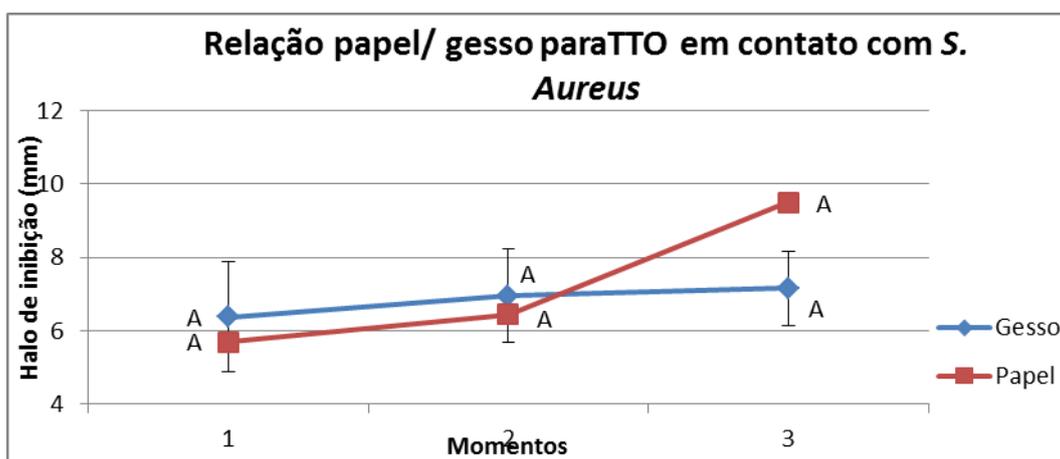
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA SUBSTÂNCIA INCORPORADA EM GESSO E PAPEL

Gráfico 9 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel em cada momento para o microrganismo *S.aureus*



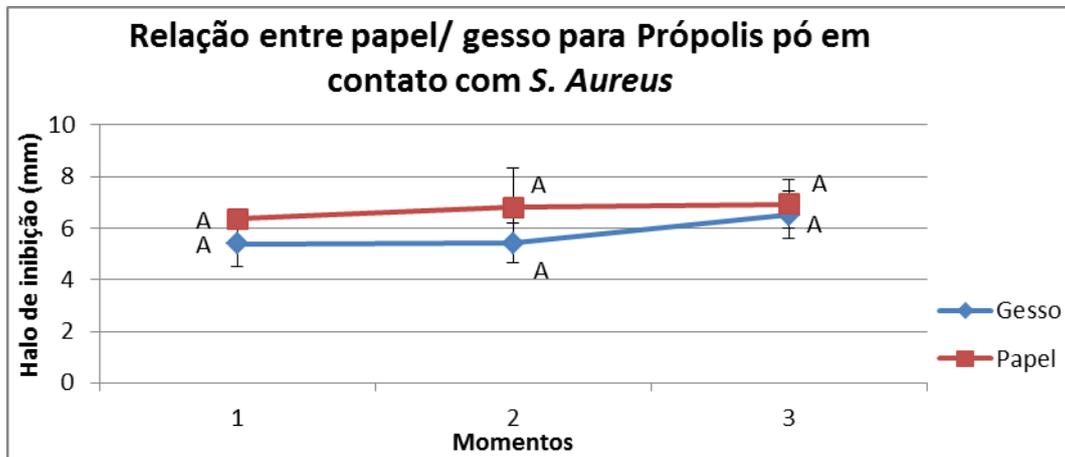
Analisando o Gráfico 9, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 10 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com TTO em cada momento para o microrganismo *S.aureus*.



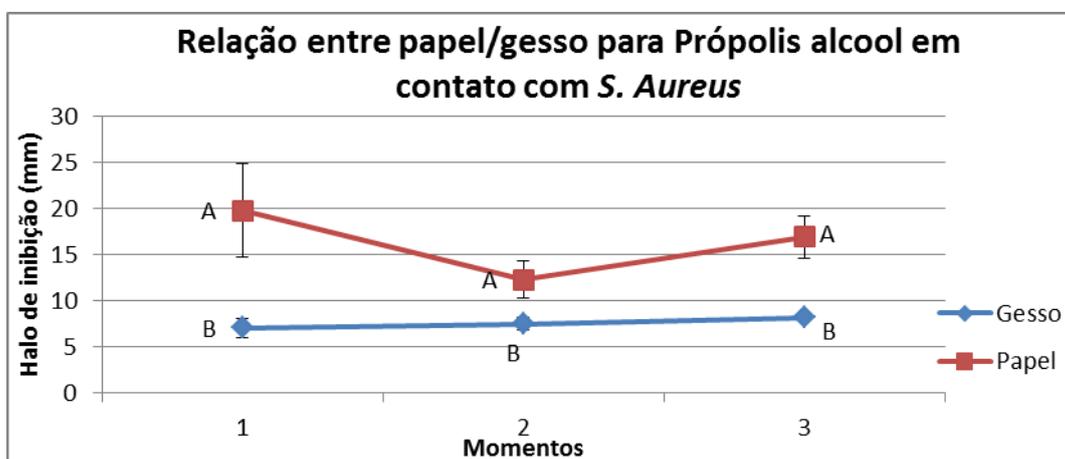
Analisando o Gráfico 10, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 11 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis pó em cada momento para o microrganismo *S.aureus*.



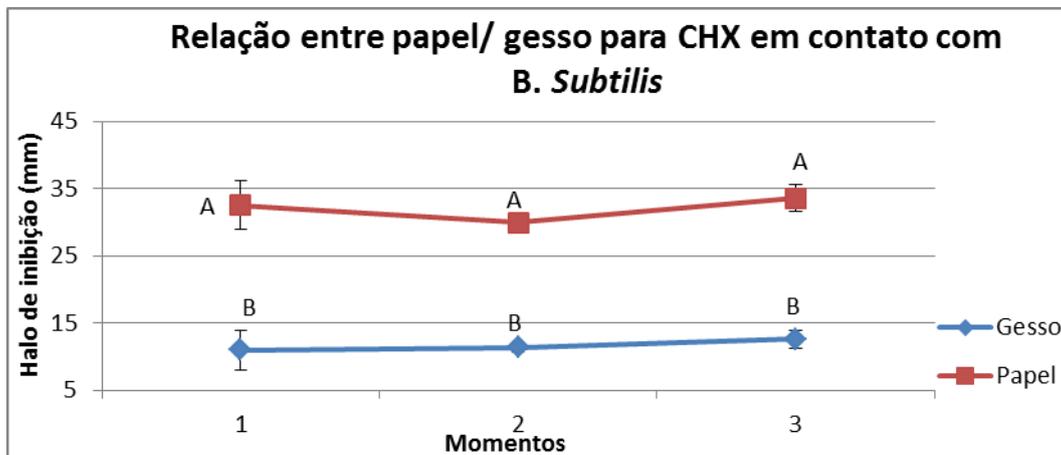
Analisando o Gráfico 11, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 12 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis álcool em cada momento para o microrganismo *S.aureus*



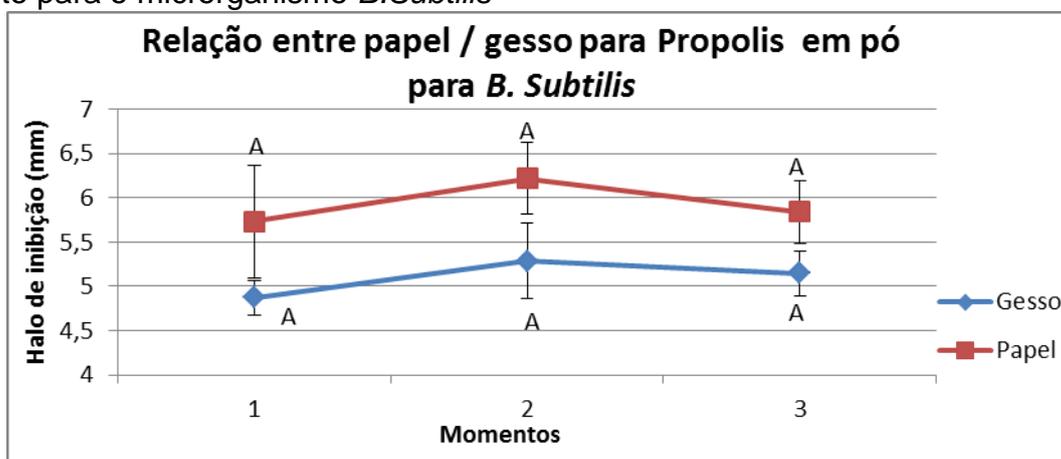
Analisando o Gráfico 12, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para todos os momentos.

Gráfico 13 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com digluconato de clorexidina em cada momento para o microrganismo *B. Subtilis*.



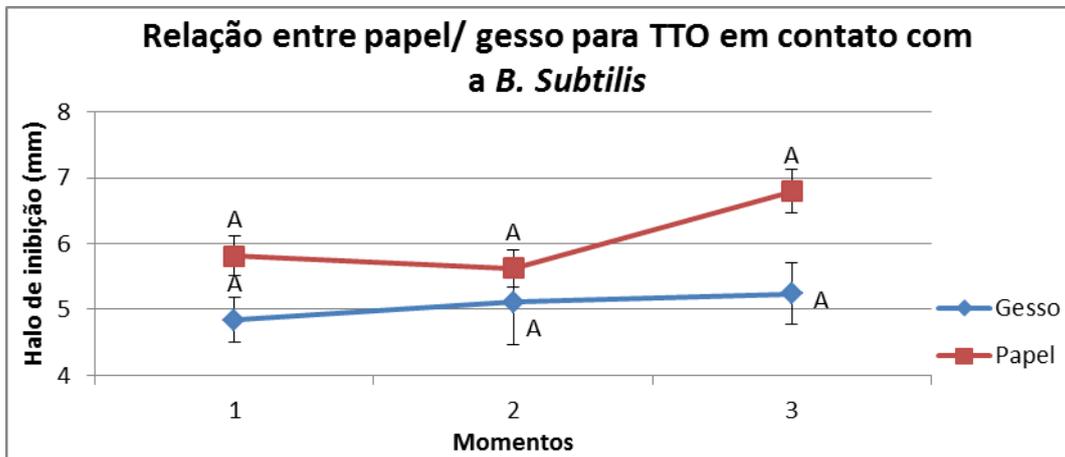
Analisando o Gráfico 13, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para todos os momentos.

Gráfico 14 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis em pó em cada momento para o microrganismo *B. Subtilis*



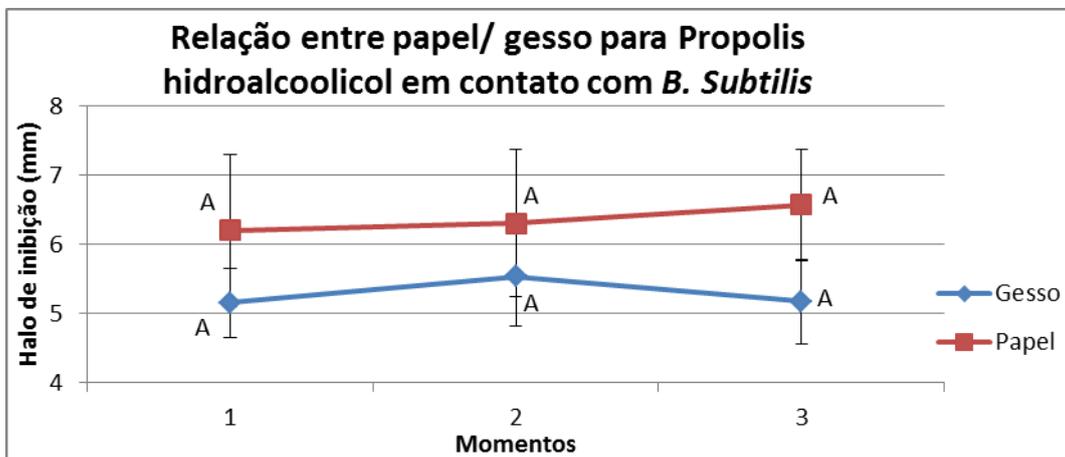
Analisando o Gráfico 14, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 15 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com TTO em cada momento para o microrganismo *B.Subtilis*.



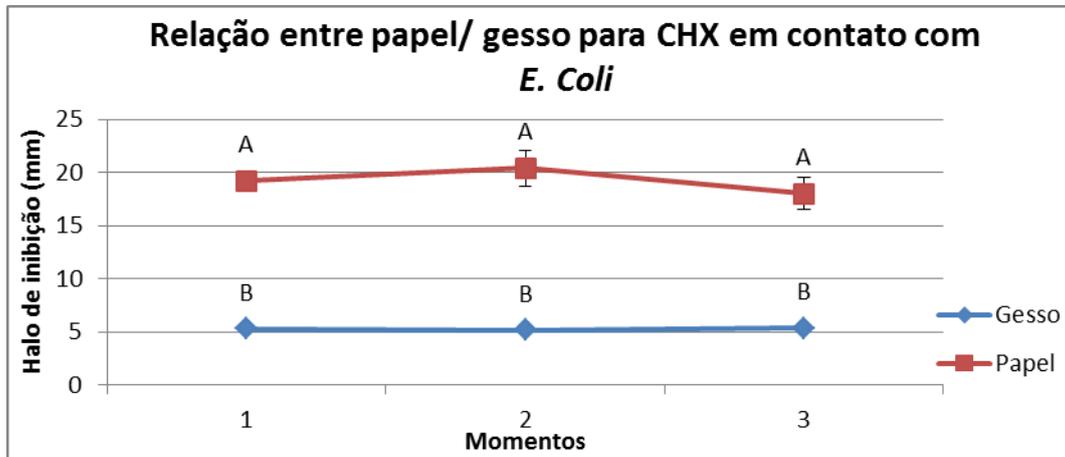
Analisando o Gráfico 15, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento

Gráfico 16 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis hidroalcooolico em cada momento para o microrganismo *B.Subtilis*.



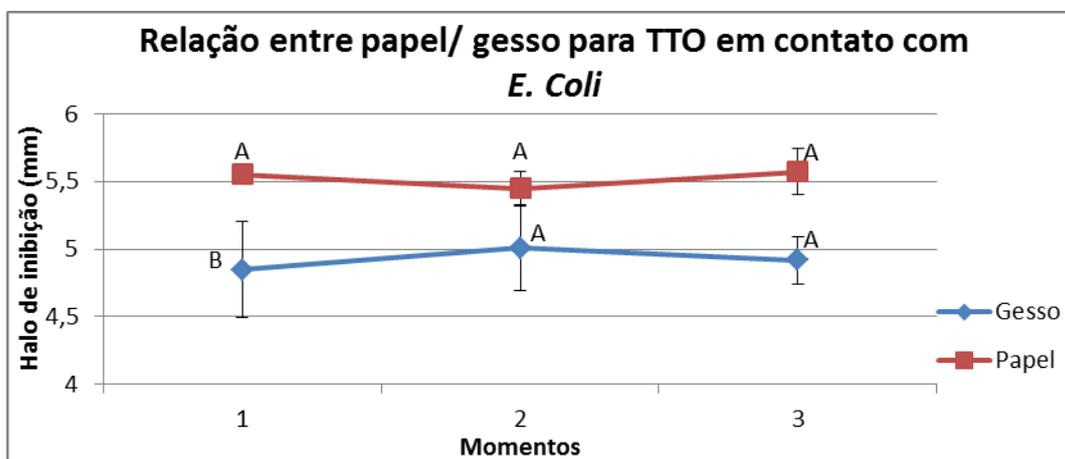
Analisando o Gráfico 16, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 17 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com digluconato de clorexidina em cada momento para o microrganismo *E.coli*.



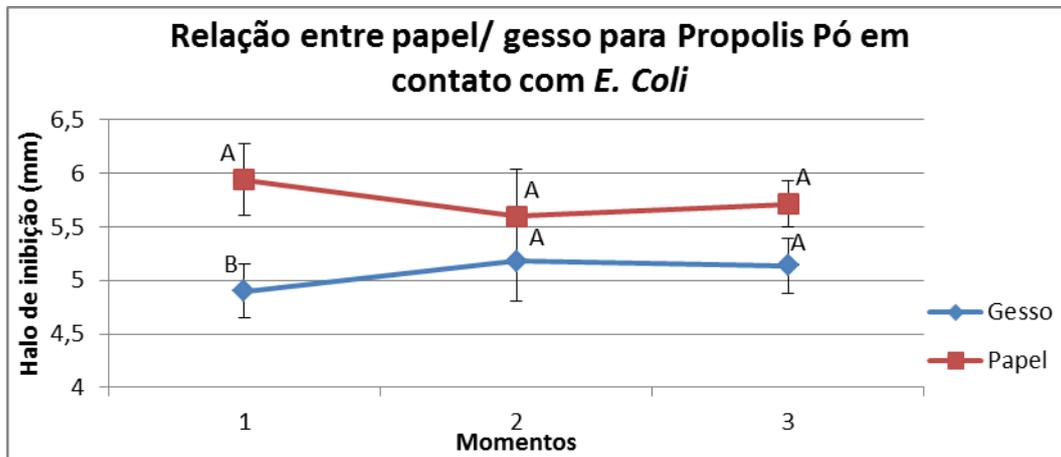
Analisando o Gráfico 17, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para todos os momentos.

Gráfico 18 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com TTO em cada momento para o microrganismo *E.coli*.



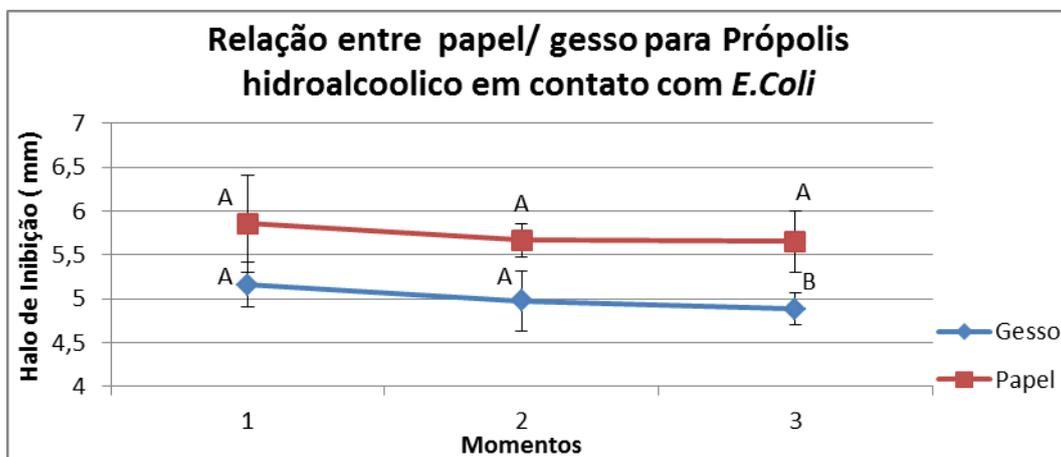
Analisando o Gráfico 18 podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento, exceto no momento 1.

Gráfico 19 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis com pó em cada momento para o microrganismo *E.coli*.



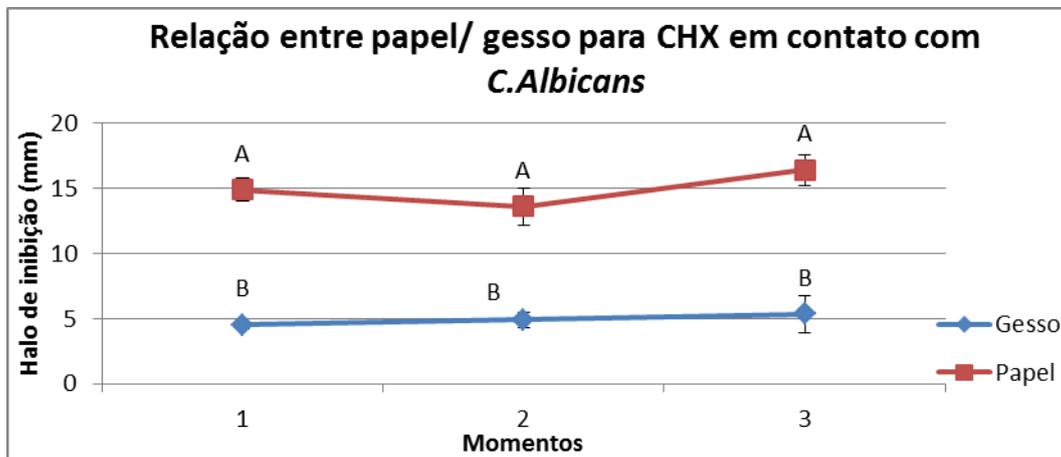
Analisando o Gráfico 19 podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento, exceto no momento 1.

Gráfico 20 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis em extrato hidroalcoólico em cada momento para o microrganismo *E.coli*.



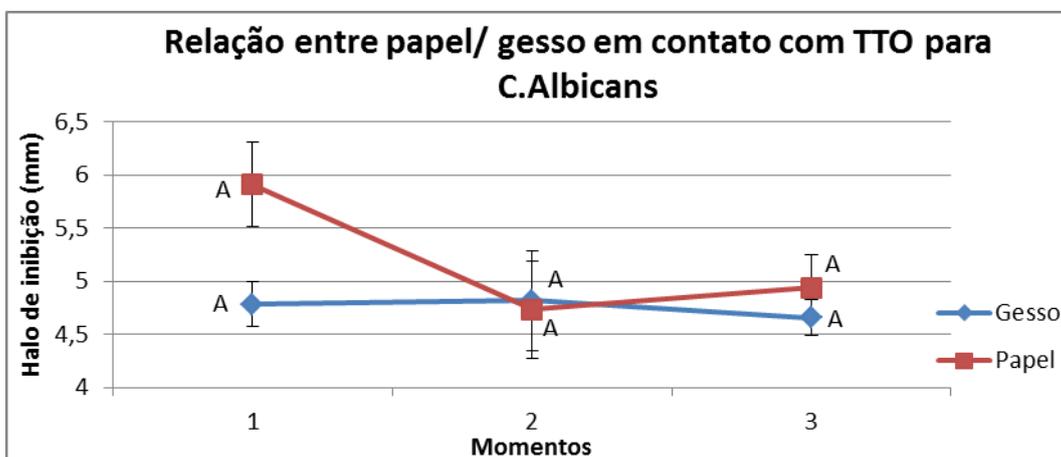
Analisando o Gráfico 20, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substancia incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento, exceto no momento 3.

Gráfico 21 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com digluconato de clorexidina em cada momento para o microrganismo *C.Albicans*.



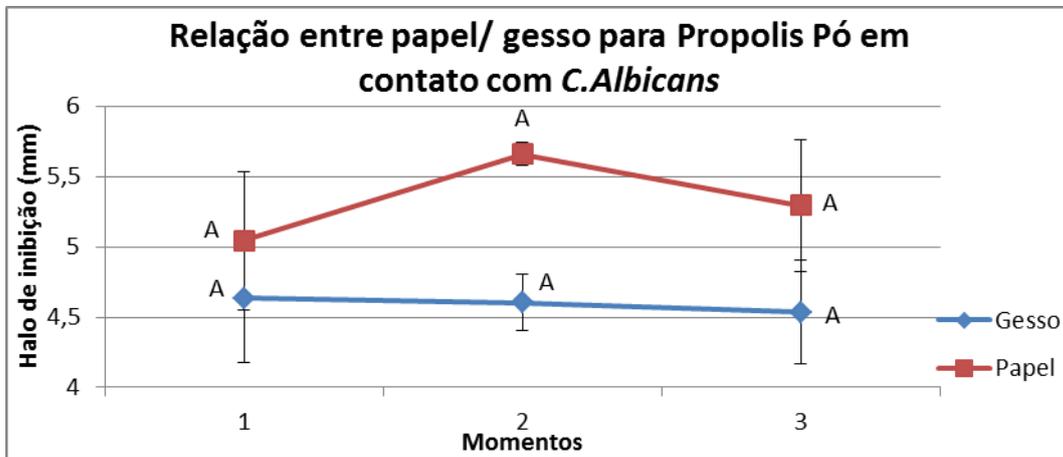
Analisando o Gráfico 21, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para todos os momentos.

Gráfico 22 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com TTO em cada momento para o microrganismo *Candida Albicans*.



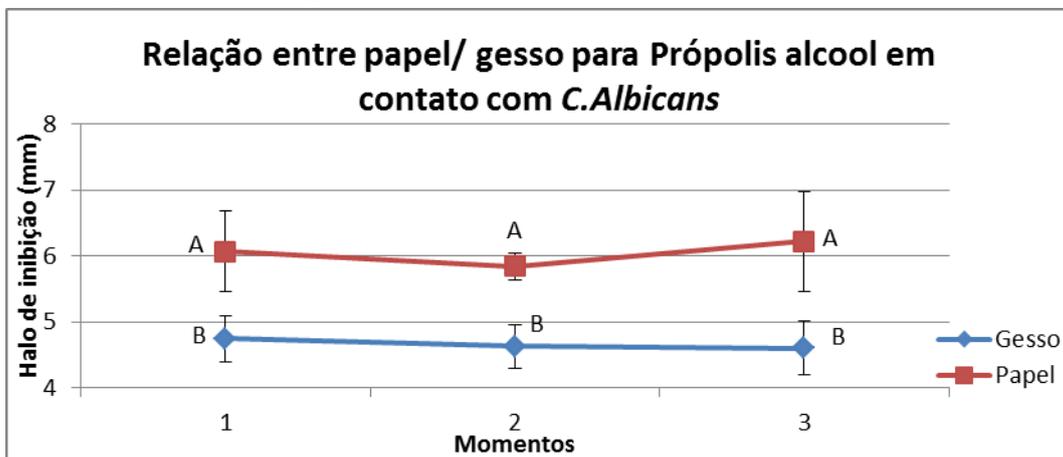
Analisando o Gráfico 22, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 23 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis em pó em cada momento para o microrganismo *C. Albicans*



Analisando o Gráfico 23, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para nenhum momento.

Gráfico 24 - Análise comparativa do grupo de gesso e papel com própolis em alcool em cada momento para o microrganismo *Candida Albicans*.

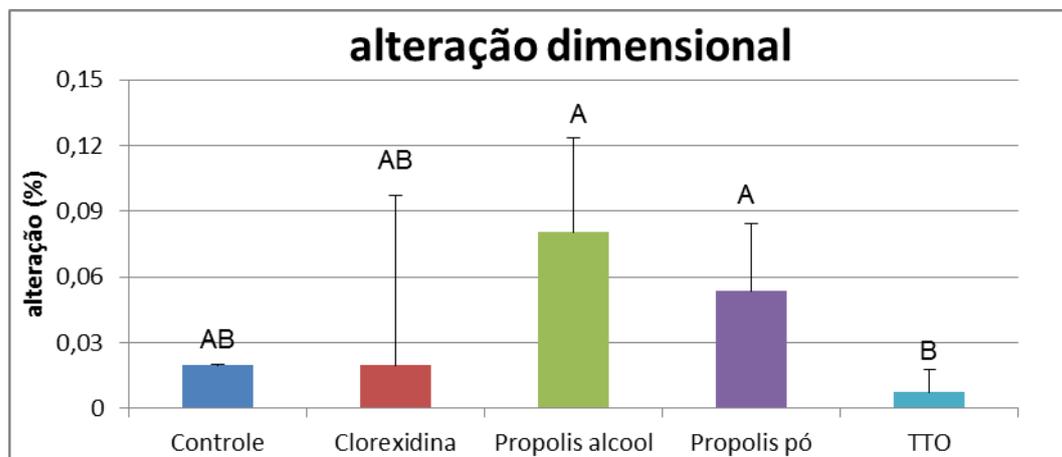


Analisando o Gráfico 24, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa de ação antimicrobiana entre a substância incorporada ao gesso e embebida no papel, para todos os momentos.

5.2 Alterações mecânicas, físicas e morfológicas-

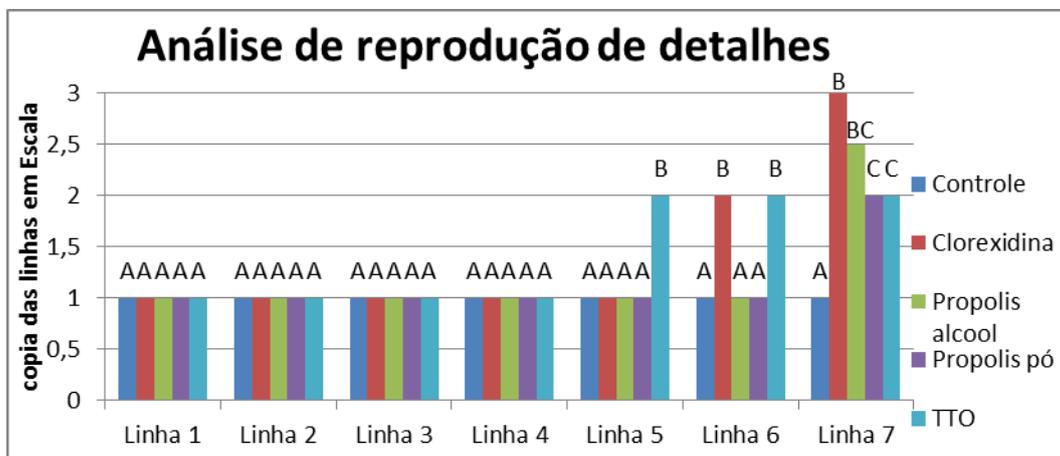
Todos os dados foram analisados em relação à presença de outliers e quanto aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homogeneidade das variáveis (teste de Levene). Para as variáveis dependentes tempo de presa, alteração dimensional e resistência à compressão do material foram utilizado o teste Anova a um critério, seguido pelo teste de Tukey para identificar a existência de diferenças significantes entre os cinco grupos de gesso. Para a variável reprodução de detalhes foi executado o teste de kruskal-Wallis, seguido de comparação aos pares (teste de Dunn) para identificar diferenças significantes entre os cinco tipos de gesso. Para todas os Gráficos a Tabela ANOVA está nos anexos.

Gráfico 25 - Alteração dimensional linear. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Tuckey pos hoc test, com $p=0,005$).



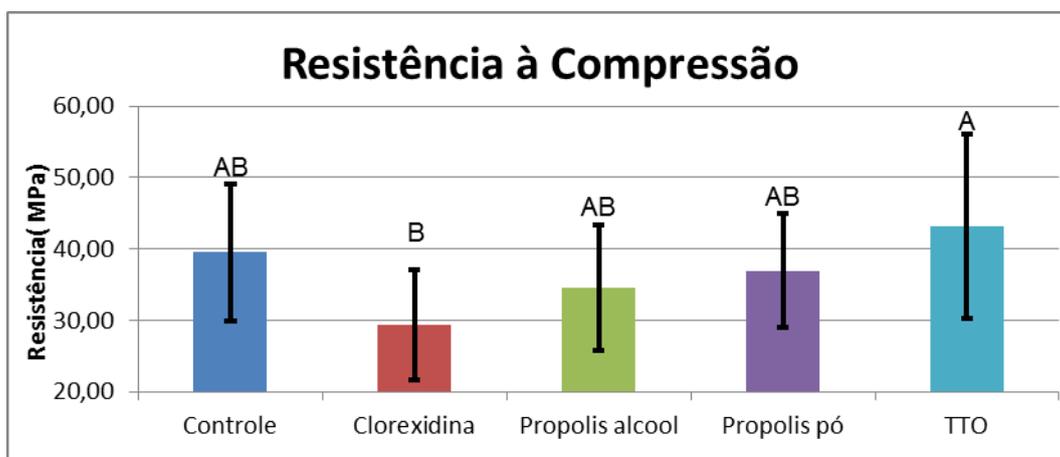
De acordo com o observado o Gráfico 25,o grupo com adição de própolis álcool e própolis pó demonstraram maior alteração dimensional em relação ao grupo do TTO, contudo sem diferença estatisticamente significativa do grupo controle e CHX.

Gráfico 26 - Análise de reprodução de detalhes. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis, seguido de comparação aos pares, $p < 0,0001$).



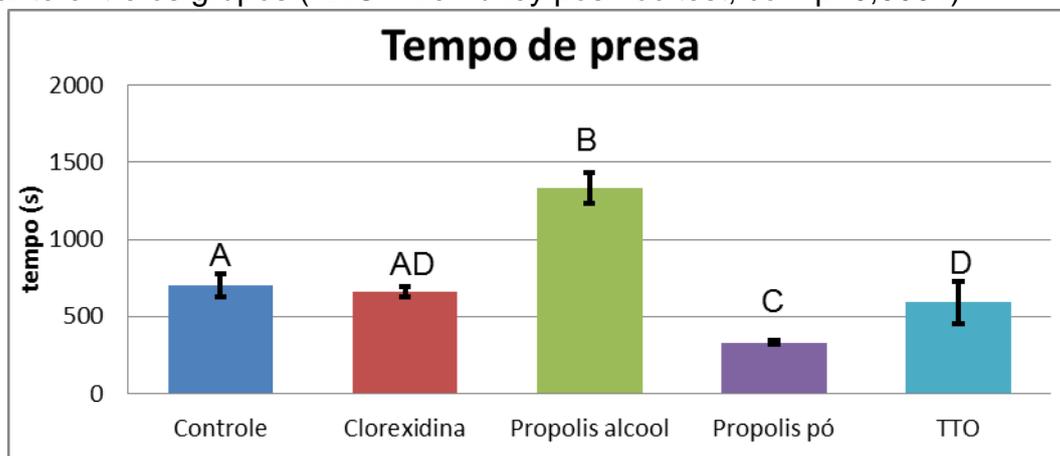
De acordo com o demonstrado no Gráfico 26, até a linha 4, todos os grupos analisados não diferem entre si, a partir da linha 5, o TTO apresenta diferença estatística dos demais. Na linha 6 o digluconato de clorexidina é semelhante ao TTO, e ambos diferem estatisticamente dos demais e na linha 7, onde o grupo com adição de clorexidina obteve maior quantidade de falhas; seguido pelo grupo com adição de extrato de própolis hidroalcoól, e por último e com menor quantidade de falhas o grupo controle e extrato de própolis seco. O valor de p é menor que 0,05, por isso tem significância.

Gráfico 27 - tensão máxima. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Tukey pos hoc test, com $p = 0,031$).



No Gráfico 27, o digluconato de clorexidina diferiu do TTO, mas todos são estatisticamente semelhantes ao grupo controle.

Gráfico 28 - Tempo de presa. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Tukey pos hoc test, com $p < 0,0001$).

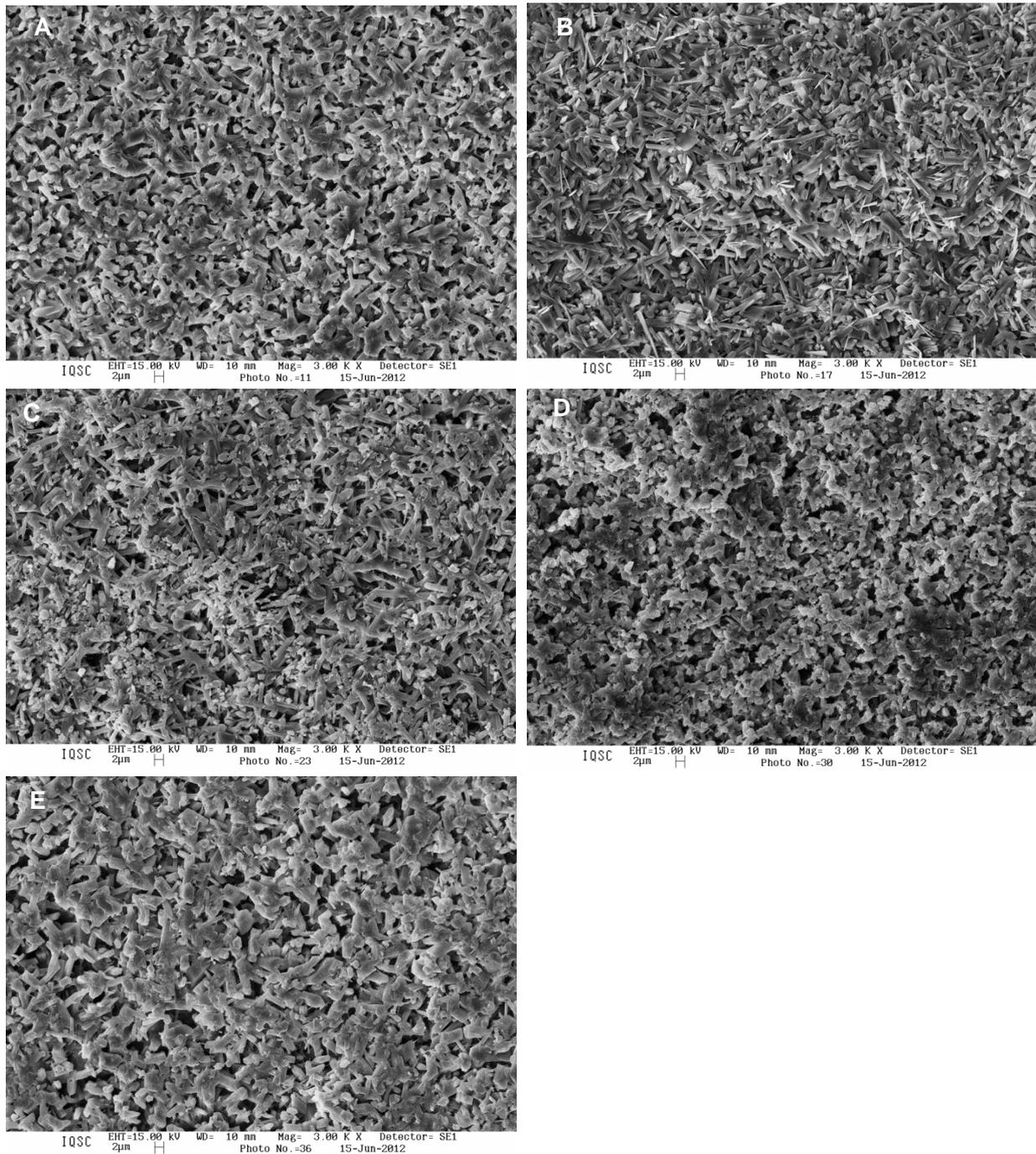


No Gráfico 28, grupo com adição de própolis álcool aumentou o tempo de presa do gesso quando comparado ao grupo controle. O grupo com adição de extrato de própolis seco diminuiu o tempo de presa do gesso quando comparado ao grupo controle. A adição de TTO diminuiu o tempo de presa do gesso odontológico quando comparado ao grupo controle, mais ainda foi maior que o grupo com adição de extrato de própolis seco.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

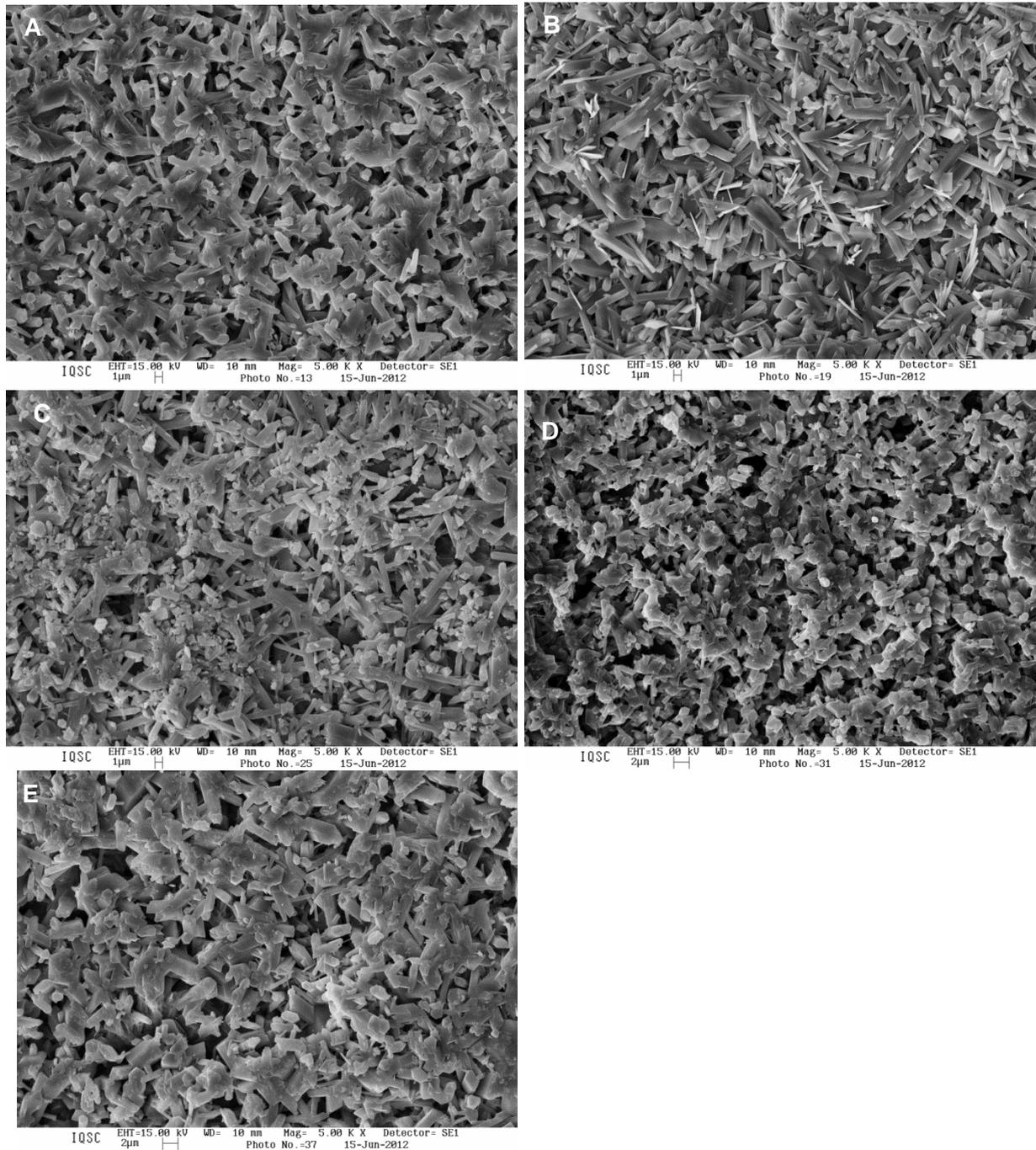
Aumento de 300 kx

Figura 7 - A- Grupo controle. B- Grupo com adição de digluconato de clorexidina. C- Grupo com adição de extrato seco de própolis. D- Grupo com adição de extrato de própolis hidroálcool. E- Grupo com adição de Óleo de Melaleuca.



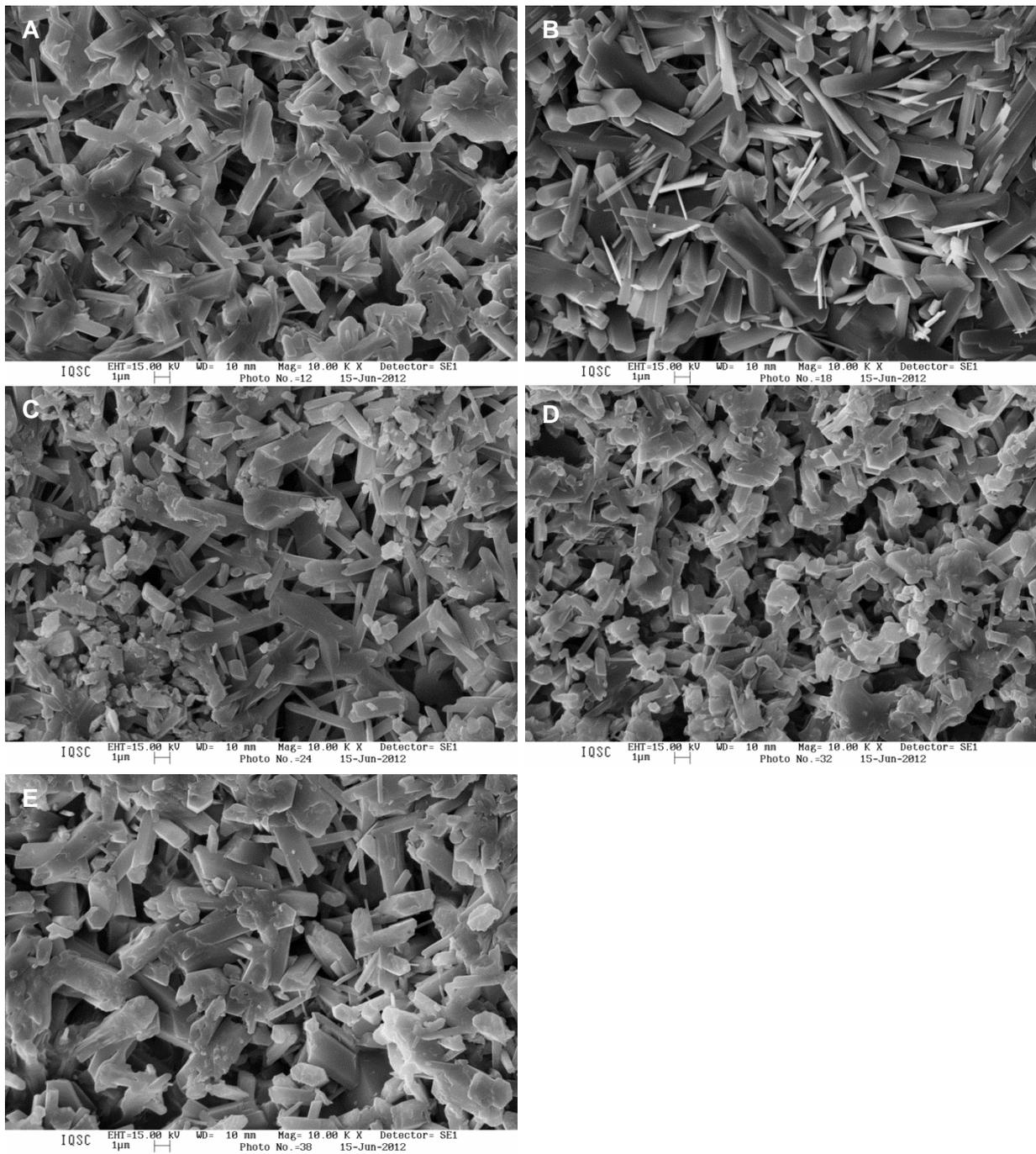
Aumento de 500 kx

Figura 8 – A- Grupo controle. B- Grupo com adição de digluconato de clorexidina. C- Grupo com adição de extrato seco de própolis. D- Grupo com adição de extrato de propolis hidroálcool. E- Grupo com adição de Óleo de Melaleuca.



Aumento de 1000 kx

Figura 9 - A- Grupo controle. B- Grupo com adição de digluconato de clorexidina. C- Grupo com adição de extrato seco de própolis. D- Grupo com adição de extrato de propolis hidroalcool. E- Grupo com adição de Óleo de Melaleuca.



Observando as fotomicrografias, tem-se o grupo controle como referencial para os demais grupos onde pode-se observar que os cristais de hemiidrato de cálcio com formas geométricas e sem espaçamentos (Figuras 7A, 8A e 9 A).

O grupo com adição de digluconato de clorexidina 2% (Figuras7B, 8B e 9 B) observa-se a formação incompleta dos cristais de hemiidrato de cálcio, onde visualmente foi observado formas em espículas em toda a amostra.

O grupo com incorporação de extrato de própolis seco e extrato de própolis hidroálcool (Figuras 7C,7D 8C, 8D, 9C e 9D) foi observado pequenas estruturas soltas em ambas as amostras.

No grupo com adição de TTO (Figuras 7E, 8E e 9 E) a disposição dos cristais de hemiidrato de cálcio com morfologia similar ao grupo controle, porém com vários espaçamentos, grande e pequenos, espalhados por toda a amostra.

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeitos Antimicrobianos

Já é conhecido que moldes de gesso removidos de moldes contém diferentes microrganismos patógenos na sua superfície^{22, 37}. Sendo assim, os modelos de gesso podem ser fonte de contaminação cruzada³⁴.

Não há relatos de estudos sobre o controle da infecção cruzada por modelos de gesso com a incorporação de substâncias naturais como óleo de Melaleuca e própolis. Com isso, o presente estudo propôs analisar a atividade antimicrobiana do óleo de melaleuca 20%; própolis em solução hidroalcoólica a 14%; extrato de própolis seco em 4,4% da massa de gesso e o desinfetante com propriedades bem descritas na literatura⁴¹ digluconato de clorexidina a 2%.

No presente estudo, os grupos de papel embebidos com as soluções desinfetantes representaram o controle negativo pois mensuraram a atividade antimicrobiana máxima de cada solução não incorporada ao gesso odontológico.

Foi observado diferença entre a capacidade de inibição do digluconato de clorexidina quando incorporada ao papel (controle negativo) e ao gesso para todos os microrganismos, exceto *S. Aureus*. Para o grupo de gesso com incorporação de própolis hidroalcoólico houve tal diferença para o microrganismo *S.aureus*.

O gesso com incorporação dessas substâncias demonstrou menor atividade antimicrobiana que o papel. Possivelmente, o gesso não deixa as substâncias difundirem pelo meio de cultura. O que leva a sugerir que para que a própolis hidroalcoólico tenha eficiência compatível com o digluconato de clorexidina, deverá apresentar altas concentrações incorporadas na massa de gesso odontológico.

De acordo com os resultados do presente estudo, o microrganismo *B.Subtilis* e *E.coli* foram afetados apenas pelo digluconato de clorexidina. Não houve diferença significativa entre os momentos, portanto não houve diminuição da atividade da substância. Tais resultados também foram descritos por Pereira et al.⁴¹ 2011.

O digluconato de clorexidina a 2% incorporado ao gesso odontológico não demonstrou atividade antimicrobiana estatisticamente significativa contra *C.Albicans*. Este resultado concorda com os resultados obtidos por Ivanovski et al.²² 1995, porém é importante ressaltar que a concentração usada pelo pesquisador foi de 0,2% e posteriormente sugeriram que concentrações maiores justificariam novos estudos.

No teste de difusão em ágar, nenhum grupo demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os momentos, portanto, não houve diminuição estatisticamente significativa da atividade da substância com o decorrer dos períodos de avaliação (1,2 e 3 momentos)

De acordo com Jennings, Samaranayake(1991) ²⁴ fungos como *C.albicans* são considerados microrganismos tão difíceis de descontaminação quanto os vírus. Contudo, Estrela et al.¹⁷, em 2003, discordam dos resultados obtidos na presente pesquisa ao afirmarem que o digluconato de clorexidina á 2% foi eficaz contra *Candida Albicans*.

Segundo Amaron et al. ⁵⁸, estas discrepâncias na ação antimicrobiana ocorre por diferença de metodologia, como inoculação dos microrganismos, PH das substâncias e incubação na estufa.

Os Gráficos de 1à 8,confirmam que o digluconato de clorexidina é o desinfetante com melhor comportamento e quando testado com o disco de papel (controle positivo. Lembrando que os discos de papel filtro são um meio para as substancias desinfetantes sem interferência da ação antimicrobiana, sua atividade desinfetante torna-se mais evidente (Gráficos de 5à 8).

Os resultados observados no presente estudo demonstram que o óleo de Melaleuca a 20% com adição de DMSO não apresenta atividade antimicrobiana significativa para os microrganismos testados, de acordo com a metodologia utilizada de difusão em ágar.

Carson et al.⁸ em 2006, relataram inibição de *S.aureus* e *E. Coli* em uma concentração muito mais elevada (50%). Porém, nessa concentração, quando incorporada ao gesso odontológico, não ocorre sua presa. Uma alternativa é a

incorporação de aditivos ao gesso, como maiores concentrações de DMSO ou goma arábica², para poder manipular o gesso com o Óleo de Melaleuca.

Os resultados para a própolis hidroalcoólico e os resultados do extrato de própolis em pó foram significativamente diferentes. Tais diferenças podem ser produzidas pelos processos de armazenagem, período da extração da forma in natura e manipulação do composto que interferem nas propriedades medicinais antimicrobianas das substâncias naturais⁹.

O presente estudo discorda dos resultados encontrados por Sforcin et al.⁴⁸ em 2000, onde foi verificada uma inibição de *S.aureus* e *E.coli* com extrato hidroalcoólico de própolis 0,4%, e 8%%. Porém deve-se ressaltar que a metodologia empregada foi determinante.

6.2 ALTERAÇÕES MECÂNICAS, FÍSICAS E MORFOLÓGICAS

TEMPO DE PRESA

O tempo de intervalo entre o início da mistura de gesso ao líquido e seu completo endurecimento é chamado de tempo de presa, é comumente mensurado pelo aparelho VICAT, normatizado pelas especificações da ADA⁴.

Baseado nos resultados pode-se verificar alteração para os grupos com adição de própolis hidroalcoólico e extrato de própolis em pó; entretanto, apesar das diferenças estatisticamente significantes do grupo controle (Tabela A4), todos os grupos estão dentro dos limites descritos pela ISO²¹, que estabelece que o tempo de presa para gesso do tipo IV está entre 6 a 30 minutos.

O tempo de presa encontrado para digluconato de clorexidina está de acordo com o encontrado por Ivanovsky et al.²² em 1995 e Lucas et al.³¹ em 2009. Contudo, para as outras substâncias desinfetantes testadas não há relatos na literatura para comparação.

ALTERAÇÃO DIMENSIONAL

A expansão dimensional durante a hidratação do sulfato de cálcio tem sido discutida²⁹ e depende da composição do gesso. A expansão linear pode variar até 0,5%

do volume total esperado, de acordo com as recomendações de Anusavice, Phillips⁵(1996).

A estabilidade dimensional do gesso tem grande importância para os modelos, pois grande alteração pode comprometer os trabalhos protéticos e sua qualidade de adaptação no paciente. Com isso, a desinfecção ideal não deveria promover alterações dimensionais.

Nos resultados encontrados todos os grupos foram estatisticamente semelhantes ao controle (Gráfico 25 e Anexos), demonstrando que estes produtos não influenciam na expansão dimensional, estando de acordo com Lucas et al.³¹ 2009.

REPRODUÇÃO DE DETALHES

A reprodução de detalhes é uma importante característica para a prótese odontológica, pois garante a adaptação da peça protética com exatidão. As especificações da ADA⁴ definem como aceitável a copia até a linha com profundidade de 0,05mm, correspondente à linha 4. De acordo com os resultados (Gráfico 26 e Tabela A4), a incorporação de desinfetantes não interferiu com a capacidade de reprodução do gesso tipo IV.

Entretanto, os piores resultados foram para o grupo com adição de Óleo de Melaleuca. Uma possível causa de tal comportamento pode ser sua característica oleosa, que durante a mistura do gesso proporcionou a incorporação de bolhas com maior facilidade.

RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Tem sido descrito na literatura a diminuição da resistência à compressão em gessos com incorporação de substâncias desinfetantes (Ivanovski et al.⁶ 1995). Contudo, neste estudo não foi observado qualquer diferença estatisticamente significativa dos grupos em comparação ao grupo controle (Gráfico 27 e Tabela A3). Desta maneira, pode-se sugerir que, em relação à resistência a compressão, a adição das substâncias analisadas poderá ser aplicada na rotina clínico/laboratorial.

MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA

As foto micrografias de MEV (Figuras 7B, 8B, 9B) mostram para o grupo com adição de digluconato clorexidina, formação de cristais com geometrias variadas, devido esta substância possivelmente interferir no processo de cristalização do gesso.

Nas Figuras 7C, 7D, 8C, 8D, 9C e 9D pode ser observado que adição dos extratos de própolis seco e hidroalcoólico produziu estruturas superficiais soltas de gesso, em forma de pó. Tais alterações foram maiores no grupo com extrato de pó. É provável que a própolis não tenha participado do processo de cristalização e tenha ficado inerte em toda amostra, dando a característica de estruturas soltas.

Observa-se pela MEV (Figuras 7E, 8E, 9 E) que a adição de TTO produziu partículas com ausência de total cristalização, gerando poros no seu interior e cristais semelhantes aos do grupo controle. Conseqüentemente, partículas menores, possivelmente, preencheram as lacunas entre as partículas maiores, obtendo uma massa mais compacta, e assim, aumentando à resistência a compressão, porem diminuindo a reprodução de detalhes. Essas bolhas no interior da amostra pode ser aprisionamento da substância, pois na cristalização do hemidrato de cálcio somente a água faz parte.

7 RELEVÂNCIA CLINICA DO ESTUDO

Clinicamente, a substância desinfetante de primeira escolha, de acordo com a metodologia utilizada, é a incorporação de digluconato de clorexidina a 2%, seguido pelo extrato de própolis hidroalcoólico. A incorporação de óleo de melaleuca e extrato de própolis seco não demonstrou efeito antimicrobiano, no presente estudo.

8 CONCLUSÃO

8.1 DA ANÁLISE ANTIMICROBIANA

Dentro das limitações desde estudo in vitro, pode-se concluir que:

- (1) O digluconato de clorexidina 2% demonstrou ser o mais efetivo desinfetante para ser incorporado ao gesso odontológico, exceto para *Candida Albicans*.
- (2) O microrganismo *S.aureus* demonstrou sensibilidade ao Própolis hidroalcoólico a 14%,
- (3) Nenhuma das substâncias testadas perderam atividade antimicrobiana até 7 dias.

8.2 DAS ANÁLISES FÍSICAS E MECÂNICAS

De acordo com a metodologia usada no presente estudo, conclui-se que:

- (1) A incorporação de digluconato de clorexidina a 2%, própolis hidroalcoólico 14%, extrato em pó de própolis e Óleo de Melaleuca não prejudicam a capacidade de reprodução do gesso, de acordo com as recomendações da ADA;
- (2) A estabilidade dimensional linear do gesso IV após a incorporação das substâncias testadas foi similar ao grupo controle;
- (3) O tempo de presa de todos os grupos está dentro dos limites estabelecidos pela ISO,
- (4) A resistência à compressão de todos os grupos foi semelhante ao grupo controle.

8.3 CONCLUSÃO GERAL

- (1) Os desinfetantes testados não apresentaram alterações mecânicas e físicas que inviabilize sua manipulação ao gesso odontológico de acordo com a ADA, ISO, e Anusavice, Phillips, porém a substância que apresentou melhor atividade antimicrobiana foi a clorexidina 2%.

REFERÊNCIAS*:

1. Amaron CVG, Aun CE, Mayer MPA. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhedine and paramonochlophenol. *Braz Oral Res.* 2004; 18(3): 242-6.
2. Abdelaziz KM, Combe EC, Hodges J S. The effect of disinfectants on the properties of dental Gypsum, Part 2: surface properties. *J Prosthodont.* 2002;11(4): 234-40.
3. Abdullah MA. Surface detil, compressive strength, and dimensional accuracy of gypsum cast after repeated immersion in hypochlorite solution. *J Prosthet Dent.* 2006; 95(6): 462-8.
4. American Dental Association - Council On Dental Materials, Instruments And Equipment. Revised ANSI/ADA Specification No. 25 for dental gypsum products. *J Am Dent Assoc.* 1981; 3: 350-1.
5. Anusavice KJ. *Phillips materiais dentários.* 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
6. Azevedo RVP, Komesu MC, Candido RC, Salvetti C, Rezende FHC. Cândida sp in the oral cavity whit and without lesions: maximal inhibitory dilution of própolis and periogard . *Rev Microbiol.* 1999; 30(1): 335-41.
7. Barlean L, Danila I, Saveanu I. Prevention of infection transmission in dental laboratories. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2011; 115(2): 548-53.
8. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 50-62.

*baseadas nas normas Vancouver. Disponível no site:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002; 73(1): S1–S6.
10. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000; 88(1): 170–5.
11. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Applied Microb*. 2001; 91(3): 492-7.
12. Dodwad V, Kukreja BJ. Propolis mouthwash: a new beginning. *J Indian Soc of Periodontol*. 2011; 15(2): 121-5.
13. Dumani A, Yoldas O, Isci AS, Köksal F, Kayar B, Polat E. Disinfection of artificially contaminated Resilon cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite at different time exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103(3): 82-5.
14. Edmondson M, Newall N, Carville K, Smith J, Riley TV, Carson CF. Uncontrolled, open-label, pilot study of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil solution in the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive wounds and its influence on wound healing. *Int Wound J*. 2011; 8(4): 375–84.
15. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*. 2007; 21(4): 308–23.
16. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*. 2003; 14(1): 58-62.
17. Estrela CRA, Estrela C, Cleômenes R, Bammann LL, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by endodontic irrigants. *Braz Dent. J*. 2003; 14(3): 187-92.

18. Fernandes Júnior A, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Cienc Rural*. 2006; 36(1): 294-7.
19. Ferreira AR, Pinto JHN, Nagem-Filho H. Determinação da magnitude de expansão de alguns tipos de gesso. *Salusvita*. 2000; 2(1): 21-8.
20. Fluent MT, Molinari JA. Dental laboratory infection control. Inside dental technology; [Internet]. 2011 [acesso em 2012 Mai 24]. Disponível em: <http://www.cdeworld.com/courses/4530-dental-laboratory-infection-control>
21. I International Organization For Standardization. Dental gypsum products - International Standard 6873. Geneve: ISO; 1998
22. Ivanovski S, Savage NW, Brockhurst PJ, Birs PS. Disinfection of dental stone casts: antimicrobial effects and physical property alterations. *Dent. Mater*. 1995; 11(1): 19-23.
23. Jagger DC, Huggett R, Harrison A. Cross-infection in dental laboratories. *Br Dent J*. 1995; 179(3): 93-6.
24. Jennings KJ, Samaranayake LP. The persistence of microorganisms on impression materials following disinfection. *Int J Prosthodont*. 1991.4(4): 382-7.
25. Abdelaziz KM, Combe EC, Hodges JC. The wetting of surfasse-treated silicone impressin matrials by gypsum mixers containing disinfectants and modifiers. *J Prosthodont*. 2005; 14(2): 104-9.
26. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(2): 141-8.
27. Kugel G, Perry RD, Fer rari M, Lalicatal P. Disinfection and communication practices: a survey of U.S. dental laboratories. *J Am Dent Assoc*. 2000; 131(6): 786-92.

28. Kwiecinski J, Eickb S, Wojcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antiml Agents*. 2009; 33(4): 343–7.
29. Leung RL, Schonfeld SE. Gypsum casts as a potential source of microbial cross-contamination. *J Prosthet Dent*. 1983; 49(2): 210-1.
30. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professional should know. *J Hosp Infect*. 2006; 64(4): 313-25.
31. Low ML, Martin C, Hill DJ, Kenward MA. Antimicrobial efficacy of silver ions in combination with tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37(2): 162–5.
32. Lucas MG, Arioli-Filho JN, Nogueira SS, Batista AUD, Pereira RP. Effect of incorporation of disinfectant solutions on setting time, linear dimensional stability, and detail reproduction in dental stone cast. *J Prosthodont*. 2009; 18(6): 521-6.
33. Madhubala MM, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2011; 37(9): 1287-9.
34. Majewski M, Koga-Ito CY, Junqueira JC, Jorge AOC. Avaliação das condutas de biossegurança aplicadas em laboratórios de prótese dentária. *Rev Biociencias*. 2004; 10(1): 161-6.
35. Mansfield SM, White AM. Antimicrobial effects from incorporation of disinfectants into gypsum casts. *Int J Prosthodont*. 1991; 4(2): 180-5.

36. Messagera S, Hammera KA, Carsona CF, Riley TV. Assessment of the antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276 and EN 12054 standard suspension tests. *J Hosp Infect.* 2005; 59(2): 113–25.
37. Minagi S, Fukushima K, Maeda N, Satomi K, Ohkawa S, Akagawa Y. Disinfection method for impression materials: freedom from fear of hepatitis B and acquired immunodeficiency syndrome. *J Prosthet Dent.* 1986; 56(2): 451-4.
38. Mitchell DL, Hariri NM, Duncanson JR MG, Jacobsen NL, Mccallum RE. Quantitative study of bacterial colonization of dental casts. *J Prosthet Dent.* 1997; 78(5): 518-21.
39. Moura CDVS, Moura WL, França FMG, Martins GAS, Feltrim PP, Zanetti RV. Disinfection of irreversible hydrocolloid impressions with sodium hypochlorite steam: assessment of antimicrobial efficacy. *Rev Odonto Ciênc.* 2010; 25: 182-7.
40. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses.* 2001; 44(9-10): 375-8.
41. Park H, Jang CH, Cho YB, C CH. Antibacterial effect of tea-tree oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation of the tympanostomy tube: an in vitro study. *In vivo.* 2007; 21(6): 1027-30.
42. Pereira RP, Lucas MT, Spolidorio DMP, Arioli Filho JN. Antimicrobial activity of disinfectant agents incorporated into type IV dental stone. *Gerodontology.* 2012; 29(2): 267-74,
43. Popova MP, Chinou IB, Marekov IN, Bankova VS. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan própolis. *Phytochemistry.* 2009(10); 70: 1262–71.
44. Raad I, Mohamed JA, Reitzel RA, Jiang Y, Raad A, Al Shuaibi M, et al. Improved antibiotic-impregnated catheters with extended-spectrum activity against resistant bacteria and fungi. *Antimicrob Age Chemother.* 2012; 56(2): 935.

45. Sánchez-González L, Cháfer M, Hernández M, Chiralt A, González-Martínez C. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*. 2011; 22(1): 1302-10.
46. Sassone LM, Fidel RAS, Murad CF, Fidel SR, Jr RH. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod. J.* 2008; 34(1): 19–24.
47. Schutt RW. Bactericidal effect of a disinfectant dental stone on irreversible hydrocolloid impressions and stone casts. *J. Prosthet. Dent.* 1989; 62(5): 605-7.
48. Schwach-Abdellaoui K, Vivien-Castioni N, Gurny R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50(1): 83-99.
49. Sforcin JM, Fernandes A Jr, Lopes CA, Bankova V, Funari SR.. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 73(1-2): 243–9.
50. Silva SMLM, Salvador MCG. Effect of the disinfection technique on the linear dimensional stability of dental impression materials. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12(3): 244-9.
51. Slot DE, Vaandrager NC, Van Loveren C, Helderma WHVP, Van der Weijden GA. The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. *Caries Res.* 2011; 45(2): 162–73.
52. Soares CR, Ueti M. Influência de diferentes métodos de desinfecção química nas propriedades físicas de troquéis de gesso tipo IV e V. *Pesqui Odontol Bras.* 2001; 15(4): 334-40.
53. Sperança PA, Santiago LM, Carvalho TBT, Neves WKF. Verificação da atividade antimicrobiana de soluções à base de própolis, sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais- estudo in vitro. *Rev Periodontia.* 2007; 17(1): 54-9.

54. Surendra GP, Anjum A, Babu CLS, Shetty S. Evaluation of dimensional stability of autoclavable elastomeric impression material. *J Indian Prosthodont Soc.* 2011; 11(1): 63–6.
55. Tebrock OC, Englemeier RL, Mayfield TG, Adams HJ. Managing dental impressions and casts of patients with communicable diseases. *Gen Dent.* 1989; 37(6): 490-5.
56. Twomey JO, Abdelaziz KM, Combe EC, Anderson DL. Calcium hypochlorite as a disinfecting additive for dental stone. *J. Prosthet.Dent.* 2003; 90(3): 282-8.
57. Umthong S, Puthong S, Chanchao C. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *Am J Chin Med.* 2009; 37: 855–65.
58. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, De Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(5): 79-84.
59. Wakefield CW. Laboratory contamination of dental prostheses. *J. Prosthet Dent.* 1980; 44(2):143- 6.
60. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod.* 1995; 21(10): 513-5.
61. Zamany A, Safavi K, Spangberg LSW. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(5):578-81.

ANEXOS

Tabela A1 - Resultado estatístico para cada microrganismo em contato com o gesso

Tratamentos	<i>Aureus</i> (Média)			<i>Aureus</i> (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	5,5888	5,8163	6,4350	,40986	,48344	,49957

CHX	15,994 0	15,812 0	16,3640	,58697	1,79844	1,93859
TTO	6,3783	6,9483	7,1600	1,50858	1,27420	1,01578
Própolis em pó	5,4000	5,4250	6,5167	,87137	,74688	,90319
Própolis álcool	7,1250	7,5300	8,1850	1,03945	,65054	,37477

Tratamentos	<i>Coli</i> (Média)			<i>Coli</i> (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	5,0088	4,9375	5,0438	,30192	,26837	,18898
CHX	5,3088	5,2075	5,3675	,21223	,33763	,16918
TTO	4,8488	5,0063	4,9163	,35353	,31048	,17353
Propolis em pó	4,8975	5,1813	5,1338	,25076	,37775	,25779
Própolis álcool	5,1571	4,9729	4,8843	,25441	,33802	,18393

Tratamentos	<i>Subtilis</i> (Média)			<i>Subtilis</i> (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	4,9360	5,2220	5,0840	,47274	,3751	,28121
CHX	10,925 7	11,328 6	12,5643	2,95817	,77826	1,37817
TTO	4,8420	5,1160	5,2420	,34150	,65949	,45948
Propolis em pó	4,8743	5,2857	5,1471	,19260	,42426	,24898
Própolis álcool	5,1557	5,5357	5,1729	,50398	,70668	,61503

Tratamentos	<i>Candida</i> (Média)			<i>Candida</i> (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	4,5617	4,5683	4,8317	,33012	,36471	,33409
CHX	4,5183	4,9317	5,3683	,31403	,58308	1,41692
TTO	4,7833	4,8150	4,6517	,21295	,46831	,16857
Propolis em pó	4,6367	4,6017	4,5350	,46198	,19934	,36871
Propolis álcool	4,7467	4,6267	4,6067	,35155	,33170	,40825

Tabela A2 - Resultado estatístico para cada microrganismo em contato com o papel filtro

Tratamentos	<i>Aureus</i> (Média)			<i>Aureus</i> (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		

	1	2	3	1	2	3
Controle	6,8340	6,3040	6,8420	,34904	,49611	,71880
CHX	18,1567	16,2700	15,4500	1,34972	,49427	2,75087
TTO	5,6950	6,4400	9,4900	,09192	,09899	,26870
Própolis em pó	6,3525	6,8100	6,9375	,32479	1,53351	,92817
Propolis álcool	19,8100	12,3033	16,9200	5,09754	1,99575	2,32955

Tratamentos	Coli (Média)			Coli (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	5,7280	5,8820	5,9060	,34098	,11498	,16180
CHX	19,1767	20,3767	17,9900	,52539	1,71039	1,51060
TTO	5,5500	5,4500	5,5700	,07071	,12728	,16971
Propolis em pó	5,9400	5,5950	5,7125	,33516	,43501	,21172
Propolis álcool	5,8533	5,6633	5,6533	,55139	,18583	,35133

Tratamentos	Subtilis (Média)			Subtilis (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	5,8440	5,8960	5,8320	,31413	,16979	,23921
CHX	32,4933	29,873	33,5667	3,64979	,81445	1,92604
TTO	5,8150	5,6300	6,795	,30406	,28284	0,33234
Propolis em pó	5,7300	6,2175	5,84	,63551	0,4025	,35336
Propolis álcool	6,2	6,3067	6,5700	1,10177	1,06800	,80728

Tratamentos	Candida (Média)			Candida (Desvio-padrão)		
	Momentos			Momentos		
	1	2	3	1	2	3
Controle	5,228	5,616	5,32	,33663	,23448	0,19222
CHX	14,8833	13,5967	16,4133	0,88286	1,42005	1,18361
TTO	5,9100	4,7300	4,9400	0,39598	0,45255	0,31113
Propolis em pó	5,045	5,66	5,2950	,49210	0,08287	,46965
Propolis álcool	6,0667	5,84	6,2167	0,60699	0,20075	,75002

Tabela A3 - Resultados e análise estatística dos testes tempo de presa, tensão máxima, alteração dimensional linear

Grupo	nome	Corpo de Prova	Tempo de presa (segundos)	Tensão Máxima (MPa)	Alteração dimensional linear (%)
gr1	controle	1	802	54,12	0,0199
gr1	controle	2	784	52,88	
gr1	controle	3	815	31,13	
gr1	controle	4	671	44,05	
gr1	controle	5	619	43,8	0,0197
gr1	controle	6	635	40,9	
gr1	controle	7	645	30,88	0,0198
gr1	controle	8	637	30,47	0,0198
gr1	controle	9	733	40,16	0,0197
gr1	controle	10	713	26,84	
	Média		705,4	39,52	0,0198
	Desvio-padrão		74,7	9,55	0,0001
gr2	CHX	1	630	34,2	0
gr2	CHX	2	618	20,53	0
gr2	CHX	3	710	27,79	0
gr2	CHX	4	657	23,27	0,0198
gr2	CHX	5	684	26,04	0,0395
gr2	CHX	6	648	32,05	0,1778
gr2	CHX	7	634	19,76	0,1195
gr2	CHX	8	696	33,21	0,1999
gr2	CHX	9	705	31,85	0,0991
gr2	CHX	10	642	45,59	0,1401
	Média		662,4	29,43	0,0796
	Desvio-padrão		33,6	7,72	0,0774
gr3	propolis alcool	1	1350	41,17	0
gr3	propolis alcool	2	1442	25,43	0,039
gr 3	propolis alcool	3	1195	45,3	0,0791
gr3	propolis alcool	4	1420	39,31	0,0795
gr3	propolis alcool	5	1239	22,4	0,139
gr3	propolis alcool	6	1412	46,23	0,079
gr3	propolis	7	1315	34,27	0,1166

gr3	alcool propolis alcool	8	1187	38,09	0,1385
gr3	propolis alcool	9	1333	24,9	0,0585
gr3	propolis alcool	10	1444	28,75	0,0753
Média			1333,7	34,59	0,0805
Desvio- padrão			98,8	8,75	0,0432
gr4	propolis po	1	325	32,39	0,0396
gr4	propolis po	2	310	47,14	0,1192
gr4	propolis po	3	348	42,66	0,0398
gr4	propolis po	4	314	31,28	0,0792
gr4	propolis po	5	323	36,09	0,0397
gr4	propolis po	6	330	41,31	0,0397
gr4	propolis po	7	350	49,12	0,0199
gr4	propolis po	8	344	25,18	0,02
gr4	propolis po	9	322	36,59	0,0595
gr4	propolis po	10	332	27,84	0,0791
Média			329,8	36,96	0,0536
Desvio- padrão			13,8	8,02	0,0311
gr5	TTO	1	707	45,01	0
gr5	TTO	2	766	34,52	0
gr5	TTO	3	700	61,67	0
gr5	TTO	4	603	41,3	0,0198
gr5	TTO	5	654	45,17	0,0198
gr5	TTO	6	473	34,83	0
gr5	TTO	7	715	31,1	0
gr5	TTO	8	377	64,33	
gr5	TTO	9	468	49,36	
gr5	TTO	10	432	24,16	0,0197
Média			589,5	43,15	0,0074
Desvio- padrão			139,7	12,87	0,010

Tabela A4 - Análise estatística dos resultados do teste reprodução e detalhes.

Grupos/ média	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7
Controle		1	1	1	1	1	1
Clorexidina		1	1	1	1	2	3
Propolis alcool		1	1	1	1	1	2,5
Propolis pó		1	1	1	1	1	2
TTO		1	1	1	2	2	2

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 04 de março de 2013.

Carolina de Assis Barros Brito

Brito, Carolina de Assis Barros

Avaliação da eficácia de substâncias naturais antimicrobianas e seu efeito em determinadas propriedades do gesso tipo IV / Carolina de Assis Barros Brito.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

79 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho

1. Sulfato de cálcio 2. Própolis 3. Desinfetantes I. Título