



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

Isabela Araguê Catanoze

Avaliação in vitro de formulações do óleo essencial de citronela (Cymbopogon nardus) sobre propriedades biológicas, físicas e mecânicas de resina acrílica para prótese dentária.

Araçatuba

2022

Isabela Araguê Catanoze

Avaliação *in vitro* de formulações do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) sobre propriedades biológicas, físicas e mecânicas de resina acrílica para prótese dentária.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência Odontológica – Área de Concentração Biomateriais.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Profa. Associada Cristiane Duque

Araçatuba

2022

Catálogo-na-Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Catanoze, Isabela Araguê.

C357a Avaliação *in vitro* de formulações do óleo essencial de
citronela (*Cymbopogon nardus*) sobre propriedades biológicas,
físicas e mecânicas de resina acrílica para prótese dentária /
Isabela Araguê Catanoze. - Araçatuba, 2022
78 f.: il.; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Profa. Cristiane Duque

1. Biofilmes 2. *Candida albicans* 3. Resinas acrílicas
4. Desinfecção 5. Estomatite sob prótese 6. *Cymbopogon*
I. T.

Black D15

CDD 617.695

Dados Curriculares

Isabela Araguê Catanoze

Nascimento: 13/06/1994 – São José do Rio Preto/SP

Filiação: Silvio Catanoze e Mariza Cristina Araguê Gomes Catanoze

(2012 – 2016) Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista).

(2017-2018) Mestrado em Ciências Odontológicas, área de Biomateriais. Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista).

(2019-2022) Especialização em Prótese Dentária. Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista).

(2018-2022) Doutorado em Ciências Odontológicas, área de Biomateriais. Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/ UNESP (Universidade Estadual Paulista).

Dedicatória

Dedico este título aos meus pais, *Silvio e Mariza*, que foram essenciais para que eu alcançasse meus objetivos profissionais. Sem eles, nada disso teria acontecido. Obrigada por todo suporte, cuidado, zelo, e por tudo que significam em minha vida.

Agradecimentos Especiais

Agradeço primeiramente a *Deus*, por ter me concedido saúde, e me guiado espiritualmente durante toda a trajetória da minha vida até o presente momento.

Agradeço imensamente aos meus pais, *Silvio e Mariza*, que construíram uma base familiar sólida e que me deram todo apoio necessário durante todas as etapas da minha vida e permitiram que eu chegasse até aqui e conquistasse este grau importante na minha formação profissional. Este título é nosso. Amo vocês. E a *Fifi*, nossa cachorrinha, um dos presentes que Araçatuba me deu, que chegou para alegrar nossas vidas, com tanto companheirismo e amor.

À minha querida orientadora e amiga *Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti*, difícil expressar em palavras seu papel em minha vida pessoal e profissional. Me ajudou a construir cada degrau da minha formação acadêmica durante estes 5 anos sendo sua orientada. Tive o privilégio de tê-la comigo em todos os momentos, tendo sempre em quem confiar e contar durante toda esta jornada. Literalmente foi minha “mãe científica” e enfrentamos todos os percalços juntas. Tive e tenho o prazer de conhecer as vertentes profissional e pessoal da Aimée. Como professora, sua paciência e didática em ensinar me cativou desde o primeiro contato na disciplina de Materiais Dentários, em 2013. Seu carinho com cada aluno e paciente é singular. Como pesquisadora, sua habilidade e organização em desenvolver cada projeto de pesquisa, a minuciosidade que tem com a escrita científica a fez ser meu espelho. Dizem que nos tornamos semelhantes aos nossos orientadores após anos de convivência. Que sorte a minha de ter uma tão especial! Exemplo de ser humano, mãe, esposa e filha. É luz e uma pessoa extremamente forte. E que força! Admiro sua fé e modo de enxergar a vida. Me ensinou muito. Passamos por muitas coisas juntas, momentos difíceis, de dificuldades, de conquistas, e nosso vínculo e confiança se tornaram tão intensos que ultrapassaram as

barreiras da Universidade e, hoje, a considero uma grande amiga. Amizade que se estendeu para a família, Heitor e Lorena são tão amados quanto ela. Sem dúvidas seus conselhos e ensinamentos fizeram a diferença em minha vida. Obrigada por ter me acolhido muito bem como sua orientada todos estes anos. Sinto muito orgulho de ser sua orientada e levar seu nome comigo. Mesmo quando eu estava em dúvida sobre os caminhos que iria seguir, você me manteve nos trilhos, e me fez acreditar que um dia tudo valeria a pena. Obrigada por ter tido paciência e me mostrado com excelência essa trajetória científica dentro da Odontologia. Obrigada por me ajudar a alcançar este título e ser realizada profissionalmente. Se hoje colho os frutos, você fez e faz parte disso. E com o fim desta etapa, não digo estas palavras com um tom de despedida, apenas um até breve e uma distância que é insignificante, pois por sincronicidade dos nossos caminhos, nossa cidade natal nos une. Fica a certeza e o coração cheio de gratidão por ganhar de presente sua amizade e por termos nos encontrado. Estaremos sempre juntas, não tenho dúvidas disso.

À minha querida coorientadora, *Profa. Dra. Cristiane Duque*, por todo suporte ao longo destes 5 anos de pós-graduação e por contribuir muito com a realização deste trabalho, por ter nos ajudado a fazer tudo acontecer com sua vasta experiência em pesquisa científica. Sempre a levarei com muito carinho e gratidão.

Ao meu amigo *Pedro Rolim*, que foi meu braço direito nos experimentos da parte microbiológica. Obrigada pela companhia, pela amizade e por todos os momentos.

À minha amiga *Vanessa Rodrigues* pela amizade, pela companhia ao longo dos anos e pela ajuda nos experimentos de citotoxicidade.

Ao meu amigo *José Roberto Matos – Betinho*, pela ajuda com a parte das propriedades físicas e mecânicas deste trabalho e pela amizade.

Agradeço todos os *meus familiares* - meus avós, tios e primos que sempre torceram por mim e vibraram com minhas conquistas.

Ao meu grande amigo, *Caio Sampaio*, que pude dividir muitos momentos nesses anos de pós-graduação, obrigada pela companhia de sempre e pela confiança.

À minha grande amiga *Carolina Nakata*, amizade de infância que permanece até o momento. Obrigada por ter me apoiado e ter sido presente.

Às minhas grandes amigas *Amanda Luz e Vanessa Gonçalves*, pela nossa amizade, que foi construída dentro da Unesp e permanece até os dias atuais, e por terem participado, mesmo à distância, de minhas conquistas.

A toda a equipe de *PD&I da Plenum Bioengenharia* - *André, Alex, Edvaldo, Elaine, Kálita, Livia, Letícia, Luiz, Márcio e Thaís*, em especial à minha gestora *Dra. Sybele Saska*, por ter confiado em meu trabalho e por ter aberto as portas para que eu pudesse realizar meu objetivo de atuar profissionalmente na área científica dentro da indústria. Obrigada a todos pela companhia e por fazerem parte desta grande conquista. Vamos em frente!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por ter sido minha segunda casa ao longo destes 10 anos e por fornecer toda minha formação profissional.

Aos amigos do laboratório de Odontopediatria que passaram pelo meu caminho ao longo dos anos: *Bruno Guandalini, Daniela Alvim, Heitor Ceolin,*

Heloisa Souza, Gabriel Nunes, Igor Zen, Jesse Augusto, Leonardo Moraes, Letícia Cabrera, Marcela Macedo, Renan Ceolin e Warlley Campos por todo suporte quando necessário e pela companhia.

Às amigas da especialização em Prótese *Bruna e Beatriz* por sempre torcerem por mim.

Ao Prof. Dr. *Paulo Henrique dos Santos*, pela amizade ao longo destes anos e por ter sido muito importante na minha formação. Obrigada professor pela companhia na disciplina de Materiais Dentários e por tudo.

À Profa. Dra. *Debora Barbosa* por todo suporte ao longo destes anos na área de Biomateriais e pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação, em conjunto com a Profa. Dra. *Daniela Micheline*. Obrigada professoras.

À Dra. *Thaila Reis* por todo suporte e ajuda conosco com a metodologia microbiológica e formulações das emulsões, e também por ter aceitado o convite para ser minha banca examinadora.

À Profa. Dra. Thayse Hosida, por ter aceitado o convite para ser minha banca examinadora e pela companhia no laboratório de Odontopediatria e Micro.

Ao Prof. Dr. Douglas Monteiro por ter aceitado o convite para ser minha banca examinadora.

Ao Laboratório de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara pela formulação das nanoemulsões.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e a Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida por terem concedido as cepas clínicas utilizadas no estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Código de financiamento 001 pela concessão da bolsa de Doutorado no período de 01/2019 a 08/2021.

Aos Departamentos de Odontopediatria e Materiais Odontológicos e Prótese por terem concedido o espaço para realização dos experimentos.

À OXIMED – São José do Rio Preto e todos os seus colaboradores, por terem feito a esterilização das amostras e sempre serem muito prestativos.

À *VIPI – Produtos Odontológicos* por fornecer a resina acrílica
utilizada neste estudo.

E a *todos* que tenham contribuído indiretamente ou diretamente para a realização deste
trabalho, deixo o meu agradecimento.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos.”

Paulo Coelho

CATANOZE, I. A. **Avaliação *in vitro* de formulações do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) sobre propriedades biológicas, físicas e mecânicas de resina acrílica para prótese dentária.** 2022. Tese de Doutorado - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

O controle de formação de biofilme deve ser promovido por meio de técnicas diárias de higienização, sendo uma delas o uso de soluções de desinfecção. Dentre as soluções químicas comercialmente disponíveis, algumas podem ocasionar efeitos adversos quando utilizadas em longo prazo. Dessa forma, a busca por métodos alternativos de desinfecção, com soluções que não alterem as propriedades do material e que sejam inertes para o seu usuário torna-se essencial. Este estudo teve como objetivos: avaliar *in vitro*, a ação antifúngica de formulações de 5 mg/mL à base do óleo de citronela em biofilmes mistos de espécie de *Candida* em resina acrílica ativada termicamente (RAAT) para base protética por meio de contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), em dois tempos de exposição (15 e 30 minutos) e avaliar a citotoxicidade das formulações em células da linhagem epitelial HaCat, e verificar a ação destas formulações de citronela a 5 mg/mL na alteração de propriedades físicas e mecânicas de amostras de RAAT. Inicialmente, foram feitas as formulações à base de citronela em forma de emulsão e nanoemulsão. Em seguida, por meio de ensaios de microdiluição em caldo, foi obtida a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das cepas de *Candida* testadas. Foram confeccionadas amostras de RAAT para a realização dos ensaios, sendo 96 amostras para o ensaio de biofilme, divididas de acordo com os grupos: GI - controle negativo (Biofilme misto *C. albicans* ATCC + *C. glabrata* ATCC + *C. albicans oral* 6892 + *C. albicans oral* 7037); GII- Nanoemulsão de Citronela 5mg/mL; GIII- Controle da Nanoemulsão (Tween 20); GIV- Emulsão de Citronela 5mg/mL; GV- Controle da Emulsão (Goma Xantana); GVI- Clorexidina 0,12% (Periogard), e 20 para o ensaio de viabilidade celular, divididas nos grupos: GI- Nanoemulsão de Citronela 5mg/mL; GII- Controle da Nanoemulsão (Tween 20); GIII- Emulsão de Citronela 5mg/mL; GIV- Controle da Emulsão (Goma Xantana); GV- Clorexidina 0,12% (Periogard). Biofilmes mistos de *Candida* foram formados sobre as superfícies das amostras, e foram quantificados por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Para o teste de viabilidade celular utilizou-se células epiteliais da linhagem HaCaT, avaliadas através da coloração com resazurina. Para

avaliação das propriedades físicas e mecânicas foram confeccionadas 50 amostras retangulares e 50 circulares de RAAT, separadas aleatoriamente em 5 grupos, de acordo com a formulação utilizada: GI – controle (água destilada); GII – saliva artificial; GIII – nanoemulsão de citronela a 5mg/mL; GIV - emulsão de citronela a 5mg/mL e GV - Clorexidina 0,12% (Periogard). As amostras foram imersas nas respectivas formulações, simulando a desinfecção de próteses dentárias pelo período de 30 minutos diários, durante 6 meses. Após este período, foi feita a análise da alteração de rugosidade de superfície ($R_a - \mu m$), estabilidade de cor (CIEDE 2000), avaliação da microdureza Knoop e resistência a flexão (MPa) das amostras. Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas ($p < 0,05$). As formulações fitoterápicas à base de citronela apresentaram valores de CIM e CFM que variaram entre 0,156-1 mg/mL sobre as espécies de *Candida* e inibiram o crescimento do biofilme misto, apresentando uma redução estatisticamente significativa na contagem de UFC/mL, de até 2,7 Log destes fungos, principalmente quando submetidas ao tempo de exposição de 30 minutos. As formulações fitoterápicas testadas não apresentaram diferenças estatísticas entre si, apresentando viabilidade da célula HaCaT maior que 70%, diferentemente da clorexidina a 0,12%. Não houve diferença nos valores médios de rugosidade de superfície em nenhum dos grupos após serem submetidos à imersão nas formulações testes, com exceção do grupo controle, que apresentou diferença estatística significativa na rugosidade de superfície após o período de imersão. Nos valores de alteração de cor (ΔE_{00}) foi possível observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais antes e após serem submetidos a imersão nas formulações testes. Nos valores de microdureza Knoop houve diferença estatística significativa apenas entre o grupo controle e o grupo emulsão de citronela. Para os dados de resistência flexural, módulo de elasticidade, força máxima e alongamento não houve diferença estatística significativa entre os grupos após imersão. Em suma, concluiu-se que as formulações fitoterápicas à base de citronela apresentaram efeito antifúngico sobre as diferentes espécies de *Candida* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias, não apresentaram efeito citotóxico sobre células da linhagem epitelial, e se mostraram seguras como formulações antissépticas no que se refere às propriedades físicas e mecânicas estudadas, sendo potencialmente promissoras para serem indicadas como soluções desinfetantes para próteses dentárias.

Palavras-chave: Biofilmes, *Candida albicans*, Resinas acrílicas, Desinfecção, Estomatite sob Prótese, *Cymbopogon*.

CATANOZE, I. A. ***In vitro* evaluation of citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil formulations on biological, physical and mechanical properties of acrylic resin for dental prosthesis.** 2022. Doctoral Thesis – Dentistry University, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

The control of biofilm formation should be promoted through daily hygiene techniques such as the use of disinfection solutions. Among the commercially available chemical solutions, some can lead to adverse effects in long-term use. Thus, the search for alternative methods of disinfection with solutions that do not interfere with properties of the material and those inert to the user becomes essential. This study aimed to: evaluate, *in vitro*, the antifungal effect of 5 mg/mL formulations based on citronella oil on mixed biofilms of *Candida* species in thermally activated acrylic resin (TAAR) for prosthetic base by counting the number of colony forming units (CFU/mL), in two exposure times (15 and 30 minutes) and to evaluate the cytotoxicity of the formulations in cells of the HaCat epithelial lineage, and to verify the action of these formulations of citronella at 5 mg/mL in the alteration of physical and mechanical properties of TAAR samples. Initially, citronella-based formulations were prepared as emulsion and nanoemulsion. Then, by means of broth microdilution assays, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the tested *Candida* strains were obtained. For the biofilm test, 96 TAAR samples were prepared and assigned to the groups, as follows: GI - negative control (Mixed biofilm *C. albicans* ATCC + *C. glabrata* ATCC + *C. albicans* oral 6892 + *C. albicans* oral 7037); GII- Citronella Nanoemulsion 5mg/mL; GIII- Nanoemulsion Control (Tween 20); GIV- Citronella Emulsion 5mg/mL; GV- Emulsion Control (Xanthan Gum); GVI- Chlorhexidine 0,12% (Periogard). For the cell viability assay, 20 samples were prepared and assigned to the following groups: GI- Citronella Nanoemulsion 5mg/mL; GII- Nanoemulsion Control (Tween 20); GIII- Citronella Emulsion 5mg/mL; GIV- Emulsion Control (Xanthan Gum); GV- Chlorhexidine 0,12% (Periogard). Mixed *Candida* biofilms were formed on the surfaces of the samples, and were quantified by counting colony forming units (CFUs). For the cell viability test, epithelial cells of the HaCaT lineage were used, evaluated by staining with resazurin. To evaluate the physical and mechanical properties, 50 rectangular and 50 circular samples of TAAR were prepared and randomly assigned into 5 groups, according to the formulation used: GI – control (distilled water); GII – artificial saliva; GIII – citronella nanoemulsion at 5mg/mL; GIV - citronella

emulsion at 5mg/mL and GV – chlorhexidine 0,12% (Periogard). The samples were immersed in the respective formulations, simulating the disinfection of dental prostheses for a period of 30 minutes daily, for 6 months. After this period, the analysis of surface roughness change (R_a - μm), color stability (CIEDE 2000), evaluation of Knoop microhardness and flexural strength (MPa) of the samples was performed. The data obtained were submitted to statistical analysis ($p < 0,05$). The phytotherapeutic formulations based on citronella presented MIC and MFC values that varied between 0,156-1 mg/mL on *Candida* species and inhibited the growth of mixed biofilm, showing a statistically significant reduction in the CFU/mL counts, up to 2,7 Log of these fungi, mainly when subjected to an exposure time of 30 minutes. The phytotherapeutic formulations tested did not show statistical differences between them, showing HaCaT cell viability greater than 70%, unlike 0,12% chlorhexidine. There was no difference in the mean values of surface roughness in any of the groups after being subjected to immersion in the test formulations, except for the control group, that presented a statistically significant difference in surface roughness after the immersion period. Regarding color change (ΔE_{00}) it was possible to observe that there was no statistically significant difference between the experimental groups before and after being subjected to immersion in the test formulations. In the Knoop microhardness values, there was a statistically significant difference only between the control group and the citronella emulsion group. For data on flexural strength, modulus of elasticity, maximum force and stretching, there was no statistically significant difference between the groups after immersion. In summary, it can be concluded that phytotherapeutic formulations based on citronella had an antifungal effect on different *Candida* species on acrylic resin surfaces for dental prostheses, besides not presenting a cytotoxic effect on cells of the epithelial lineage, and proved to be safe as antiseptic formulations in the which refers to the physical and mechanical properties studied, being potentially promising to be indicated as disinfectant solutions for dental prostheses.

Keywords: Biofilms, *Candida albicans*, Acrylic resins, Disinfection, Stomatitis, Denture, *Cymbopogon*.

Sumário

Introdução Geral	18
Capítulo 1	21
Capítulo 2	50
Anexo A	68
Anexo B	69
Anexo C	70
Anexo D	72
Anexo E	76

Introdução Geral¹

O uso de próteses dentárias favorece o acúmulo de biofilme e alimentos, e vários fatores físicos são importantes na colonização microbiana de superfícies sólidas, como a rugosidade da superfície, a hidrofobicidade e a composição química da superfície do material, constituindo-se em regiões preferenciais de colonização de determinados microrganismos.^{1,2} Dentre os microrganismos presentes na microbiota oral, os do gênero *Candida* estão normalmente presentes, e geralmente não causam doença. Porém, sob certas circunstâncias, estes podem agir como agentes infecciosos, causando o aparecimento de candidíase, inclusive em pacientes submetidos à quimioterapia.³⁻⁵ Também foi relatado que o gênero *Candida albicans* é responsável por 70% dos casos de estomatites protéticas.⁶⁻⁸

Geralmente a candidíase é tratada à base de antifúngicos poliênicos (nistatina) e azólicos (fluconazol, miconazol, itraconazol). O uso indiscriminado de drogas antifúngicas pode trazer como consequência, a resistência destes microrganismos aos agentes antimicrobianos.^{9,10} Além disso, o miconazol interage com outras drogas e induz alterações hepáticas. A nistatina tem um sabor desagradável, e alguns indivíduos apresentam desconforto gastrointestinal, como náuseas, vômitos e diarreia.¹¹ A literatura relata que as estomatites causadas pelo gênero *Candida glabrata* apresentam uma maior dificuldade de tratamento, pois esta espécie é intrinsecamente menos ativa para antifúngicos convencionais da classe azólicos quando comparada ao gênero *C. albicans*.¹² Assim, é desejável promover a saúde por meio de terapias naturais ou alternativas, como o uso de fitoterápicos.

As resinas acrílicas à base de polimetilmetacrilato (PMMA) são comumente utilizadas na confecção da base acrílica das próteses, e dentre as propriedades requeridas neste material, aquelas relacionadas com a superfície, como a rugosidade, são de grande importância clínica, já que facilitam o acúmulo de biofilme e manchamento.¹ A redução da rugosidade de superfície resulta em um retardamento da formação e maturação do biofilme. Embora a rugosidade e energia de superfície atuem conjuntamente, a influência da rugosidade é dominante.¹³ A importância de ambos os parâmetros justifica a necessidade de superfícies lisas.¹³⁻¹⁵

É preconizado valores de rugosidade próximos ou inferiores a 0,2 µm, para dificultar a adesão microbiana.¹⁶ Um dos principais requisitos para que uma prótese total seja considerada satisfatória é que a superfície que fica em contato com a mucosa jugal esteja bastante lisa. Assim, o polimento da base da prótese (PMMA) e a manutenção de sua lisura, contribuem para

¹ Referências: Anexo E

o conforto do paciente, estética agradável e para que seja minimizada a retenção de microrganismos na superfície da mesma. Dessa forma, qualquer procedimento que altere a rugosidade de superfície do material irá influenciar diretamente na adesão de microrganismos,^{17,18} uma vez que a presença de irregularidades funciona como abrigo microbiano, aumentando a probabilidade destes microrganismos permanecerem nas superfícies, mesmo depois dos procedimentos convencionais de limpeza.^{1,15,19}

Para ocorrer a colonização da base protética pelos fungos da espécie *Candida*, algumas características do substrato são importantes, como a energia livre de superfície, que pode influenciar diretamente no processo de colonização.²⁰ Após serem expostos às condições da cavidade oral, os materiais que constituem a base protética são recobertos por saliva e outros constituintes, como diferentes proteínas com diferentes polaridades, podendo alterar a hidrofobicidade destes materiais, tendo esta camada influencia direta na adesão de biofilme.^{21,22} Além disso, as diferenças no grau de hidrofobicidade da membrana celular das espécies de *Candida* é um fator que influencia no efeito antifúngico e na capacidade da levedura se aderir à resina acrílica, visto que *C. albicans* é considerada mais hidrofílica quando comparada a espécie *C. glabrata*, que apresenta comportamento hidrofóbico.²³⁻²⁵

A estética também é um fator muito importante a ser considerado na reabilitação oral, seja por meio de próteses totais, parciais fixas e removíveis e/ou sobre implantes.²⁶ A estabilidade da cor dos dentes artificiais e da base protética é um dos objetivos almejados pelo cirurgião-dentista, tornando-se imprescindível que ela se mantenha ao longo do tempo para se conseguir sucesso e longevidade da reabilitação oral.²⁷ Dessa forma, as soluções de desinfecção não devem acarretar alterações nesta propriedade física dos materiais relacionados com a prótese.

O controle de biofilme pode ser realizado por meio de técnicas diárias de higienização, feitas pelo próprio paciente. Essa rotina de higiene deve ser realizada por meio de técnicas de limpeza mecânica oral e extraoral, por meio de enxaguatórios bucais e soluções desinfetantes com produtos químicos, técnicas essas que se complementam. Dentre as soluções químicas comercialmente disponíveis, tanto para uso intraoral quanto extraoral, destaca-se a solução de clorexidina, devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, impedindo a proliferação de microrganismos.^{28,29} Entretanto, o uso da clorexidina tem que ser indicado com cautela, visto que existem efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento de dentes artificiais e os materiais da base da prótese³⁰⁻³², alteração do paladar,^{33,34} citotoxicidade,³⁵ além de descamação da mucosa oral.³⁶ Dessa forma, a busca por métodos

alternativos de desinfecção, com soluções que não alterem as propriedades do material e que sejam inertes para o seu usuário torna-se essencial.

A fitoterapia, sendo de baixo custo e fácil utilização, destaca-se como alternativa a ser pesquisada, dada a escassez de estudos em Odontologia. A planta conhecida como citronela (*Cymbopogon nardus*) é utilizada para a extração de óleo essencial, muito utilizado como repelente de insetos, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, geraniol e o citronelol, que são antissépticos, daí seu extenso uso em sabões e desinfetantes domésticos.^{37,38} Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa eficácia antimicrobiana e bons resultados de citotoxicidade em certas concentrações.^{37,39,40} Como por exemplo, seu uso como agente desinfetante de próteses buco-maxilo-faciais.^{41,42} Nesse sentido, a citronela é considerada como uma planta de ação antibacteriana e antifúngica potencial, abrindo novas perspectivas de controle de infecção humana. Com base nestas informações, percebe-se a necessidade da realização de estudos que investiguem a sua ação antibiofilme e sua ação na alteração das propriedades dos materiais utilizados na confecção de próteses. Diante disso, os objetivos gerais deste estudo foram avaliar *in vitro*, a ação antifúngica de formulações à base do óleo de citronela em biofilmes mistos de espécie de *Candida* em resina acrílica ativada termicamente (RAAT) para base protética e avaliar a citotoxicidade das células da linhagem epitelial HaCat, e verificar a ação destas formulações de citronela na alteração de propriedades físicas e mecânicas de amostras de RAAT.

Capítulo 1

Efeito antifúngico e citotóxico de formulações do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) em biofilmes mistos de *Candida* em resina acrílica para prótese dentária.

RESUMO

Declaração do problema. A estomatite protética é associada à colonização microbiana da base acrílica das próteses, favorecida pela higiene deficiente das mesmas e pelo alto nível de *Candida* spp. na cavidade oral. A *Candida* é o gênero fúngico mais comumente associado à esta patologia oral, geralmente tratada com antifúngicos e soluções antissépticas. Muitas destas espécies de *Candida* se tornaram resistentes aos medicamentos e produtos existentes comercialmente. Assim, é desejável a realização de estudos que investiguem alternativas naturais, tais como a utilização de fitoterápicos.

Objetivo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vitro*, a ação antifúngica de formulações à base de óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*), em cultura planctônica de espécies de *Candida*; avaliar o efeito antibiofilme destas formulações em biofilmes mistos de espécie de *Candida* em resina acrílica ativada termicamente (RAAT) para base protética em dois tempos de exposição, 15 e 30 minutos, e avaliar *in vitro* a citotoxicidade das formulações fitoterápicas em célula da linhagem epitelial (HaCaT).

Materiais e Métodos. Formulações à base de citronela em forma de emulsão e nanoemulsão foram manipuladas. Em seguida, por meio de ensaios de microdiluição em caldo, foi obtida a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das cepas de referência testadas: (*Candida albicans* ATCC 26790 e *Candida glabrata* - ATCC 2001) e duas cepas clínicas (*Candida albicans* oral - 6892 e *Candida albicans* oral - 7037). Amostras de RAAT foram divididas (n=116), sendo 96 para o ensaio de biofilme e 20 para o ensaio de viabilidade celular. Biofilmes mistos de *Candida* foram formados sobre as superfícies das amostras, e quantificados por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Para o teste de viabilidade celular utilizou-se célula epitelial da linhagem HaCaT, determinada pela coloração com resazurina. Os dados obtidos de UFCs e viabilidade celular foram submetidos à análise estatística ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados. As formulações fitoterápicas à base de citronela apresentaram atividade antifúngica forte sobre as espécies de *Candida* e inibiram o crescimento do biofilme misto,

apresentando uma redução estatisticamente significativa na contagem de UFC/mL destes fungos, principalmente quando submetidas ao tempo de exposição de 30 minutos. As formulações fitoterápicas testadas não apresentaram diferenças estatísticas entre si, apresentando viabilidade celular maior que 70%, diferentemente da clorexidina a 0,12%, solução controle utilizada neste estudo.

Conclusão. Foi possível concluir que as formulações fitoterápicas à base de citronela apresentaram efeito antifúngico sobre o crescimento de diferentes espécies de *Candida* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias, e não apresentaram efeito citotóxico sobre células da linhagem epitelial.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Este estudo comprovou a eficácia de formulações à base de óleo de citronela sobre biofilme misto de importantes espécies fúngicas relacionadas à estomatite protética. Diante dos resultados de baixa citotoxicidade, estas formulações fitoterápicas poderiam ser uma alternativa de princípio ativo em diversos produtos, como soluções enxaguatórias, géis mucoadesivos e desinfetantes para higienização de próteses dentárias.

INTRODUÇÃO²

O crescimento da população idosa é uma realidade no cenário brasileiro e um fenômeno mundial, consequentemente muitos pacientes usuários de próteses são ou serão idosos no futuro. É fato que o uso de próteses dentárias favorece a retenção de biofilme e o desenvolvimento de infecções. Em virtude do processo de envelhecimento acarretar alterações fisiológicas (senescência) e ser agravado por certas condições patológicas predisponentes (senilidade), os idosos tendem a perder a capacidade funcional para as atividades diárias, sendo a higiene bucal uma delas.¹

Alguns fatores associados, como o declínio da resposta imunológica, a higiene bucal deficiente e a diminuição da salivagem pelo uso constante de medicamentos, favorecem a proliferação de leveduras, contribuindo para a proliferação de *Candida* spp. na cavidade bucal de idosos.²⁻⁴ Esses microrganismos estão normalmente presentes na cavidade bucal e, geralmente não causam patologias. Porém, sob certas circunstâncias, como em usuários de próteses dentárias em que o fluxo de oxigênio e saliva para o tecido subjacente é reduzido,⁵ eles podem agir como agentes infecciosos, causando o aparecimento de candidíase.³ Geralmente estas patologias são tratadas à base de antifúngicos poliênicos (nistatina) e azólicos (fluconazol, miconazol, itraconazol). O uso indiscriminado de drogas antifúngicas pode trazer como consequência, a resistência destas cepas aos agentes antimicrobianos.^{6,7} O miconazol interage com outras drogas e induz alterações hepáticas. A nistatina tem um sabor desagradável, e alguns indivíduos apresentam desconforto gastrointestinal, como náuseas, vômitos e diarreia.⁸ Além disso, a resistência a estes antifúngicos de uso mais convencional entre as cepas clínicas, tem sido amplamente descrita.⁹⁻¹¹

A estomatite protética é frequentemente associada à colonização microbiana da base acrílica das próteses dentárias, favorecida pela higiene deficiente das mesmas e pelo alto nível de *Candida* spp. na saliva.^{12,13} *Candida albicans* é a espécie fúngica mais comumente associada à estomatite protética, sendo responsável por cerca de 24-75% dos casos de infecção.¹⁴⁻¹⁸ Estudos mostram que outras patologias podem estar associadas ao biofilme da prótese, como por exemplo, infecções gastrointestinais e pulmonares, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou idosos, pela deglutição e aspiração contínua de microrganismos do biofilme da prótese.¹⁹⁻²¹ Das várias propriedades de virulência do gênero *C. albicans*, a formação de biofilme em superfícies acrílicas desempenha um papel crítico para a manutenção

² Esta tese apresenta-se em formato de artigo, de acordo com as normas do periódico *Journal of Prosthetic Dentistry* – Anexo A

da higiene oral.^{22,23} Biofilmes representam nichos exclusivos, onde os microrganismos são envolvidos em uma matriz extracelular, que os protegem da ação de agentes antimicrobianos, da saliva e da própria resposta imune do hospedeiro.^{24,25} Estudos na literatura reportam a investigação das características de biofilmes mistos de múltiplas espécies de *Candida* e a interação entre elas.^{13,26-29}

A espécie fúngica *Candida glabrata* também representa uma ameaça aos usuários de próteses dentárias, visto que sua incidência é uma preocupação crescente, e está relacionada a incidência de infecções sistêmicas relacionadas ao gênero *Candida*, especialmente em pacientes imunocomprometidos.^{30,31} As estomatites protéticas causadas pela espécie *C. glabrata* apresentam uma maior dificuldade de tratamento, devido esta espécie ser intrinsecamente mais resistente a classe dos agentes antifúngicos azólicos, em comparação a espécie de *C. albicans*, que apresenta maior susceptibilidade a este tipo de tratamento.³² Por outro lado, *C. albicans* apresenta alguns fatores de virulência ausentes nas espécies de *C. glabrata*, como a capacidade de formação de hifas na etapa de adesão e formação de biofilme.³³

O controle de formação de biofilme é muito importante para manter a saúde geral e da cavidade oral dos usuários de próteses. Isto deve ser promovido por meio de técnicas diárias de higienização, realizadas pelo próprio paciente. Essa rotina de higiene deve ser realizada por meio de técnicas de limpeza mecânica intraoral e extraoral, por meio de enxaguatórios bucais e soluções desinfetantes com produtos químicos, técnicas essas que se complementam. Dentre as soluções químicas comercialmente disponíveis, tanto para uso intraoral quanto extraoral, destaca-se a solução de clorexidina, devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, impedindo a proliferação de microrganismos.^{34,35} Entretanto, o uso da clorexidina tem que ser indicado com cautela, visto que existem efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento de dentes artificiais e os materiais da base da prótese,³⁶⁻³⁸ alteração do paladar,^{39,40} citotoxicidade,⁴¹ além de descamação da mucosa oral.⁴² Dessa forma, a busca por métodos alternativos de desinfecção, com soluções que não alterem as propriedades do material e que sejam inertes para o seu usuário torna-se essencial.

Assim, é desejável promover a saúde por meio de terapias naturais ou alternativas, tais como a utilização de fitoterápicos. A fitoterapia, destaca-se como alternativa em potencial a ser pesquisada, dada a sua aplicabilidade na Odontologia. A planta conhecida como citronela (*Cymbopogon nardus*) é utilizada para a extração de óleo essencial, muito utilizado como repelente de insetos, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, o citronelol e o nerol, que são antissépticos, daí seu extenso uso em sabões e desinfetantes domésticos.⁴³⁻⁴⁶ Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa

eficácia antimicrobiana^{43,47,48} e baixa citotoxicidade em certas concentrações.⁴⁶ Estudos também comprovam seu uso como agente desinfetante de próteses buco-maxilo-faciais.^{49,50} Nesse sentido, a citronela é considerada como uma planta de ação antibacteriana e antifúngica potencial, abrindo novas perspectivas de controle de infecção humana.

Os óleos essenciais são compostos aromáticos, formados por hidrocarbonetos, que possuem uma diversidade de grupos funcionais, extraídos das plantas através de algum processo físico específico (geralmente hidrodestilação), e têm como principal característica o fato de, em sua maioria, serem altamente voláteis. Assim, a otimização da formulação de forma a obter um sistema eficiente para encapsular seus princípios ativos e liberá-los de forma controlada, faz-se necessário. Para se obter maior estabilidade das soluções à base de óleos essenciais, uma das opções é sua formulação em forma de emulsões e/ou nanoemulsões, visando uma melhor eficácia terapêutica e proporcionando melhores mecanismos de estabilização das propriedades destes produtos.^{51,52}

Uma emulsão é uma dispersão coloidal de um líquido em outro líquido, no qual o primeiro é imiscível. As nanoemulsões são sistemas nanoestruturados usados para o carregamento de drogas, atuam aumentando a biodisponibilidade e a permeação através das barreiras biológicas, enquanto mantêm uma liberação controlada da droga e as protegem contra os mecanismos de degradação.^{53,54} Estudos prévios publicados na literatura científica relatam diferentes tamanhos de partículas para as nanoemulsões, podendo apresentar faixas de variações de 10 nm até 500 nm.⁵⁵⁻⁵⁷

Para permitir que um óleo seja disperso em água, é necessário adicionar uma molécula anfifílica para garantir estabilidade. Do contrário, as gotículas de óleo se colidem, fundindo entre si, ou seja, elas coalescem.⁵⁸ A goma xantana é um aditivo alimentar utilizado na fabricação de diversos produtos, sendo um tipo de carboidrato proveniente de uma bactéria não patogênica, a *Xanthomonas campestris*. Após um processo industrial, essa goma é solidificada com a adição de álcool isopropílico e transformada em um pó branco que dá origem à goma xantana propriamente dita, sendo utilizada como espessante, emulsificante e estabilizante, podendo melhorar a textura, consistência, sabor, prazo de validade e aparência de muitos produtos. Dessa forma, ela estabiliza os alimentos, ajudando a suportar diferentes temperaturas e níveis de pH.⁵⁹

Com base nestas informações, a utilização do óleo essencial de citronela nas formas de emulsão ou nanoemulsão, ainda não foram testadas, podendo apresentar vantagens, como o aumento da eficácia antimicrobiana e a maior estabilidade das formulações.⁶⁰ Neste contexto,

percebe-se a necessidade da realização de estudos que investiguem a ação antifúngica de formulações à base de citronela, na busca por maior eficácia e menor efeito citotóxico.

O propósito deste estudo foi avaliar *in vitro*, a ação antifúngica de formulações à base do óleo de citronela em biofilmes mistos de espécie de *Candida* em resina acrílica para base protética por meio de contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), em dois tempos de exposição e avaliar a citotoxicidade das formulações em células da linhagem epitelial HaCat. As hipóteses testadas foram as de que as formulações utilizadas apresentariam ação antifúngica e inibiriam o crescimento das espécies de *Candida* em amostras de RAAT, e não apresentariam toxicidade para as células superior à da clorexidina a 0,12%.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nanoemulsão contendo óleo essencial de citronela

A formulação foi feita de acordo com Duarte et al⁶¹ com modificações, no Laboratório de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. Uma formulação contendo 5 mg/mL (p/p) de óleo essencial de citronela (OE), concentração definida através de estudos prévios com o óleo puro, polissorbato 20 (Tween 20) na proporção tensoativo: óleo 1:1 e água q.s.p. 10 g foi proporcionada. O óleo e o tensoativo foram pesados em um frasco de vidro e homogeneizados em agitador magnético. Em seguida foi adicionada a fase aquosa sob gotejamento obtendo-se então a pré-emulsão. Esta foi sonicada por 2 minutos, com *pulse on* de 1 minuto e *pulse of* de 30 s (Anexo B e C).

Emulsão contendo óleo essencial de citronela

Foi preparada uma emulsão de citronela diluída em goma xantana. Para isso, 0,5 g de goma xantana malha 200 foi dispersa em 100 mL de água destilada. Essa solução foi mantida em repouso por 16 horas em temperatura ambiente, sendo posteriormente esterilizada em autoclave à vapor (Phoenix Lufenco) a 127°C por 20 minutos. Para o preparo da emulsão, foi feito o resfriamento da solução contendo goma xantana, e adicionado óleo essencial de citronela (OE) a fim de obter-se uma concentração final de 8 mg/mL de OE. A mistura foi dispersa em dispersor mecânico, 2000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. A emulsão final foi

armazenada em tubos de centrifugação de 50 mL, envoltos por papel alumínio a 4 °C (Anexo B e C).

Efeito antifúngico em cultura planctônica por meio de ensaios de microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Inicialmente, curvas de crescimento foram realizadas para as espécies fúngicas com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para estas atingirem suas fases de maior multiplicação celular (fase log ou exponencial). Os ensaios para obtenção da CIM para a citronela foram realizados pelo método de microdiluição usando microplacas de 96 poços estéreis (Kasvi), baseados nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI:M27-2A) com modificações.⁶² As cepas de *Candida* foram reativadas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA; Difco) por 24 horas. Cerca de 5 colônias foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo Sabouraud e incubado em estufa por 24 horas. Após esse período, 500 µL de cada cultura dos microrganismos foi inoculado em outro tubo contendo 5 mL de um novo caldo Sabouraud fresco. A cada 2 horas foram realizadas leituras da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro a 550 nm (Eon Microplate; BioTek), até o valor da leitura se estabilizar. Estas culturas foram plaqueadas em meio específico para obtenção dos valores de Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). Foi definido o valor de densidade óptica (DO) de 0,3 (10^3 UFC/mL). Em seguida, um inóculo de 50 µL de cada cepa contendo meio caldo Sabouraud fresco já ajustado na densidade óptica e concentração adequada foi incubado em 50 µL da diluição seriada das soluções fitoterápicas contendo citronela (emulsão e nanoemulsão de citronela), iniciando com a concentração de 4 mg/mL para a emulsão, e 2,5 mg/mL para a nanoemulsão, no primeiro poço. Após incubação por 24 horas a 37 °C em condições de aerobiose, as placas de microtitulação foram analisadas a 595 nm em um leitor de microplacas modelo 3550-UV (Bio-Rad) após a aplicação de uma solução de resazurina (Sigma) a 5 µg/mL por 3 horas.

Suspensões microbianas foram incubadas com clorexidina 0,12% ou sem a presença das soluções fitoterápicas de citronela, como controles positivo e negativo, respectivamente. A CIM foi definida como a menor concentração das soluções fitoterápicas testadas e da clorexidina em que não houvesse crescimento detectável (coloração azul da viragem da resazurina). Os meios contendo a CIM e duas concentrações maiores foram diluídas seriadamente e plaqueadas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA; Difco) e incubadas a 37

°C por 24 horas em condições de aerobiose para obtenção da CFM. Foi realizada a contagem das UFCs com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed) e determinado o número de UFC/mL. A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada quando as soluções mataram 100% das espécies de *Candida* testadas. Para os ensaios subsequentes de biofilme, as soluções à base de citronela foram formuladas com o equivalente a 10x o CFM.⁴⁶ Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata e em dois dias independentes, perfazendo um $n = 8$.

Confecção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)^{46,63}

Foram confeccionadas 116 amostras de RAAT (VipiCril Plus; VIPI Produtos Odontológicos), sendo 96 para o ensaio de biofilme e 20 para o ensaio de viabilidade celular. Foi utilizada uma matriz metálica vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada ($n=10$). Após a inclusão em mufla e manipulação da RAAT, a mesma foi polimerizada pelo método convencional, de acordo com o fabricante. Em seguida as amostras foram submetidas ao polimento em uma politriz universal semi-automática (Arotec S.A. Ind Com), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (#400, #600, #800 e #1200; Buehler), sendo finalizadas com solução diamantada em disco de feltro. Em seguida foi realizada a padronização da espessura das amostras numa faixa de 2,5 a 2,6 mm, utilizando a lixa de granulação 400 com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda). Por fim, as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Ultracleaner 1400; UNIQUE) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem (ANEXO D).

Determinação dos grupos do estudo

As seguintes cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas neste estudo: *Candida albicans* (ATCC 26790) e *Candida glabrata* (ATCC 2001), fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, e duas cepas clínicas também foram utilizadas: *Candida albicans oral* (6892) e *Candida albicans oral* (7037), cedidas pela Faculdade de Medicina de Rio Preto – FAMERP.

As 96 amostras de RAAT foram divididas nas placas de 24 poços, em 6 grupos (n=4 amostras por grupo, por ensaio), perfazendo dois ensaios independentes (n=8 no total), para cada tempo de tratamento (15 e 30 minutos): GI - controle negativo (Biofilme misto *C. albicans* ATCC + *C. glabrata* ATCC + *C. albicans* oral 6892 + *C. albicans* oral 7037); GII- Nanoemulsão de Citronela 5mg/mL; GIII- Controle da Nanoemulsão (Tween 20); GIV- Emulsão de Citronela 5mg/mL; GV- Controle da Emulsão (Goma Xantana); GVI- Clorexidina 0,12% (Periogard). As amostras foram coladas com fita dupla face no interior dos poços das placas de poliestireno e esterilizadas com óxido de etileno (Oximed, São José do Rio Preto, SP, Brasil), para serem posteriormente submetidas aos ensaios. Os tempos de tratamentos foram simulados baseados no tempo de desinfecção química sugeridos pela literatura para próteses dentárias.^{64,65}

Ensaio de biofilme

Cepas e condições de crescimento^{63,66}

Após o conhecimento da DO dos microrganismos, estabelecida por curva de crescimento, iniciou-se os testes de ensaio de biofilme. As espécies de *Candida* foram descongeladas e repicadas em Ágar Sabouraud Dextrose para reativação, da mesma maneira em que foi realizada nas curvas de crescimento. Logo após a reativação, uma alçada de cada cepa foi coletada das placas e inoculadas em 5 mL de meio Sabouraud caldo e então, mantidos em estufa de aerobiose (O₂) por 24 horas, a 37 °C.

Após o período de incubação foram retirados 500 µL do overnight das espécies de *Candida* e adicionados em um tubo novo, um para cada espécie, contendo 5 mL de caldo Sabouraud dextrose para crescimento de células novas e obtenção da DO em 0,3 nm como estabelecido nas curvas de crescimento. A DO foi atingida entre 2 a 3 horas. Após isso, cada espécie foi diluída para ajuste de quantidade de células (10³ células/mL). Foram utilizadas as seguintes diluições: *C. albicans* (ATCC 26790) - Diluição 1000x, *C. albicans* oral – (6892): Diluição 1000x, *C. albicans* oral – (7037): Diluição 1000x, *C. glabrata* (ATCC 2001): Diluição 10000x. Foi realizada a pré-adesão com saliva artificial sobre as superfícies das amostras de RAAT previamente coladas no interior de poços de placas de poliestireno (24 poços) por 2 horas em incubação. A saliva artificial foi manipulada tendo em sua composição, para cada 1 litro de água deionizada, os seguintes ingredientes: 2 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich), 5 g de peptona bacteriológica (Sigma-Aldrich), 2 g de glicose (Sigma-Aldrich), 1 g de mucina

de estômago de porco (Sigma-Aldrich), 0,35 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,2 g de CaCl_2 (Sigma-Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich).⁶⁷

Após o ajuste de células de todas as cepas de *Candida*, foi adicionado 250 μL de cultura de cada espécie ajustada nos poços contendo as amostras, totalizando um volume final de 1 mL de inóculo misto por poço ($n=4$ em cada grupo). As placas foram levadas em agitadora orbital a 120-130 rpm, em 37 °C por 24 horas.

Tratamento do biofilme misto com as soluções fitoterápicas

Após a formação do biofilme misto foi realizado o tratamento com as soluções fitoterápicas contendo óleo de citronela e a solução de clorexidina a 0,12% como controle. Passadas as 24 horas, foi feita a remoção da cultura de cada poço contendo as amostras, e inserido 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7) para lavar as células e remover as que não foram aderidas. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma nova placa de 24 poços com o auxílio de pinças estéreis.

Para o tratamento foi inserido 1 mL de cada solução fitoterápica e os controles (nanoemulsão a 5 mg/mL, controle da nanoemulsão, emulsão de citronela a 5 mg/mL, controle da emulsão e clorexidina 0,12%), nos poços respectivos de cada grupo, contendo as amostras ($n=4$ em cada grupo), para cada ensaio independente (Fig.1). No grupo controle foi adicionado apenas a solução salina. Estas soluções foram testadas no tempo de 15 e 30 minutos, simulando a desinfecção de próteses dentárias e/ou o uso das mesmas como produtos antissépticos orais, na forma de géis ou pomadas mucoadesivas. Após as soluções estarem em contato com as amostras contendo o biofilme, elas foram levadas em agitadora orbital 120-130 rpm a 37 °C pelo tempo determinado (15 e 30 minutos).

Após o tempo estabelecido, as soluções de tratamento foram removidas de cada poço, e 1 mL de solução salina foi inserida para possibilitar a raspagem do biofilme (10x) das amostras. Este conteúdo foi inserido em microtubos do tipo eppendorf, e foram levados para centrifugação (8000 rpm – 5 minutos). Em seguida, foi feita a remoção do sobrenadante, e o pellet foi ressuspensionado em solução salina, e agitado vigorosamente com o auxílio de um vórtex, seguido do plaqueamento para contagem de UFC/mL. Os experimentos foram realizados em dois ensaios independentes.

Quantificação das células viáveis

O número de células viáveis dos biofilmes formados nas amostras de RAAT, na presença das soluções fitoterápicas foi avaliado por contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs/mL). Suspensões de biofilme (20 µL de cultura para 180 µL de solução tampão PBS) foram vigorosamente agitadas durante 90 s e diluições decimais seriadas (em PBS; pH 7, 0,1 mol L⁻¹) foram plaqueadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco) para contagem de colônias de *Candida*. Após 24 horas de incubação das placas para crescimento em estufa de O₂, a 37 °C, o número de UFCs/mL foi contado manualmente.

Ensaio de Viabilidade Celular (Citotoxicidade)

Determinação dos grupos do estudo

As 20 amostras de RAAT foram divididas nas placas de 24 poços (Fig. 2), em 5 grupos (n=2), perfazendo dois ensaios independentes (n=4 no total): GI- Nanoemulsão de Citronela 5mg/mL; GII- Controle da Nanoemulsão (Tween 20); GIII- Emulsão de Citronela 5mg/mL; GIV- Controle da Emulsão (Goma Xantana); GV- Clorexidina 0,12% (Periogard).

Condições de crescimento celular

Foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando célula epitelial da linhagem HaCaT. As células HaCaT foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco BRL) contendo 10% de soro fetal de vitelo e 100 µg mL⁻¹ de penicilina G/estreptomicina. As células foram cultivadas a 37 °C em 5% de CO₂ até atingirem a confluência de 80%. As células epiteliais foram desprendidas após tratamento com tripsina-EDTA (TrypLETM Expressar; Life Technologies Inc.) a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, 3x o volume de DMEM foi adicionado e a cultura celular foi coletada em tubos e centrifugadas a 500 xg durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio DMEM fresco, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em uma microplaca de 96 poços (200 µL/poço, 1x10⁴ células/mL), incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ por 24 horas.

Aplicação das formulações

As amostras de RAAT foram posicionadas no interior de cada poço da placa de 24 poços contendo 1 mL das soluções fitoterápicas e solução de controle positivo (solução de clorexidina a 0,12%) e foram incubadas à temperatura ambiente. Decorrido a exposição das amostras aos

tratamentos, as mesmas foram levadas em contato com discos de papel absorvente por 5s para remoção do excesso de líquido, sem secá-las completamente, e então transferidas para um novo poço contendo 1 mL de DMEM. Esta etapa corresponde à utilização da prótese pelo paciente, após a remoção da mesma da solução desinfetante ou antisséptica, sendo recolocada em contato com a mucosa ainda apresentando alguns resíduos da solução. Em seguida, foi realizada as diluições seriadas de 1, 1/2, 1/4. Após 24 horas do plantio da HaCat em placas de 96 poços, removeu-se o meio de cultura e posteriormente foi aplicado 200 µL de cada formulação após as diluições realizadas previamente na placa de 24 poços. As células ficaram em contato com essas formulações pelo período de 12 horas.

Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio da coloração com resazurina. Após a exposição aos fitoterápicos, os meios de cada poço foram aspirados e substituídos por 200 µL de uma solução de resazurina estéril (70 µM; Sigma Aldrich), para que então as células fossem incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 4 horas, protegidos da luz.⁶⁸ Posteriormente, A solução foi transferida para uma placa de 96 poços para medir a D.O. a 570 nm em um espectrofotômetro (Eon Microplate; BioTek). O controle negativo (DMEM) foi definido como 100% de viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em duplicata.⁶⁹

Forma de análise dos dados

Os dados de contagem microbiana obtidos para o ensaio de biofilme foram convertidos em Log (UFC/mL). Os mesmos foram analisados quanto a sua homogeneidade (Shapiro Wilks), a fim de determinar se provinham ou não de uma distribuição normal. Como a distribuição dos dados foi paramétrica, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguido do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$). Para os dados obtidos no teste de viabilidade celular, como os mesmos apresentaram uma distribuição normal, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguida do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$), utilizando-se o programa IBM SPSS 20.0 (IBM; Armonk).

RESULTADOS

Na Tabela 1 é possível observar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os fungos testados. Os valores encontrados

variaram entre 0,156-1mg/mL. Na Tabela 2, pode-se observar a quantificação do biofilme sobre as amostras de RAAT em Log UFC/mL, sendo que o GI (controle negativo) apresentou uma média de 6,28 para o tempo de 15 minutos, e 6,01 para o tempo de 30 minutos. As menores contagens de Log UFC/mL foram as obtidas pelos biofilmes tratados com a solução de clorexidina a 0,12% (GVI- Periogard - controle positivo), com valor médio de 0.01, seguido dos tratamentos com as soluções teste. Foi possível notar que houve diferença estatística significativa entre os valores de Log UFC/mL das soluções de nanoemulsão de citronela a 5 mg/mL (NC) e emulsão de citronela a 5 mg/mL (EC) utilizadas em biofilme misto de *Candida* e o grupo controle negativo (C), para ambos os tempos testados, de 15 e 30 minutos, sem diferença estatística entre as soluções. Nota-se também, que houve diferença estatística entre os tempos de imersão, para a emulsão de citronela (EC), demonstrando uma maior eficácia da solução no tempo de 30 minutos de imersão, reduzindo a contagem do biofilme de 4,33 para 3,3 (Log UFC/mL). Dessa forma, os melhores resultados de eficácia antifúngica, para ambas as soluções teste, foram os obtidos com o tempo de 30 minutos. Não houve redução estatisticamente significativa do biofilme em relação ao controle negativo (GI), quando os grupos controles da emulsão (GV) e nanoemulsão (GIII) foram utilizados.

Na Figura 3, estão apresentados os resultados da porcentagem de viabilidade celular após diluições seriadas do resíduo das formulações nas amostras de RAAT. É possível observar que todas as formulações testadas nas diluições de 1, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ não apresentaram diferenças estatísticas entre si, e apresentaram viabilidade celular maior que 70%, exceto para o grupo controle positivo (clorexidina a 0.12% - Periogard) que apresentou diferença estatística significativa nas diluições 1 e $\frac{1}{2}$, apresentando uma menor viabilidade celular quando comparada às soluções fitoterápicas à base de citronela. A diluição 1 apresentou valor abaixo de 70% de viabilidade celular. Já a diluição de $\frac{1}{4}$ foi semelhante às demais soluções testadas, não apresentando diferença estatística significativa.

DISCUSSÃO

A hipótese deste estudo de que as formulações utilizadas inibiriam o crescimento das diferentes cepas de *Candida* testadas foi aceita, comprovando o efeito antifúngico do óleo essencial de citronela. Ficou evidente, com base nos resultados, que tanto a emulsão quanto a nanoemulsão de citronela possuem atividade inibitória sobre espécies de *Candida*. Das duas soluções fitoterápicas analisadas, nanoemulsão e emulsão de citronela, ambas inibiram o

crescimento do biofilme misto de espécies de *Candida*, apresentando uma redução estatisticamente significativa na contagem de UFC/mL destes fungos, principalmente quando submetidas a um tempo maior de exposição (30 minutos). Estes resultados encontrados são semelhantes e corroboram com estudos publicados na literatura, que investigaram a eficácia e ação antifúngica do óleo essencial da planta *Cymbopogon nardus* em diferentes espécies de *Candida*.^{46,49,70,71}

As formulações de nanoemulsão e emulsão à base de óleo de citronela demonstraram diferentes graus de inibição das espécies de *Candida* conforme evidenciado pelos valores de CIM/CFM. Os valores encontrados no presente estudo variaram entre 0,156-1 mg/mL para os fungos testados, achados que corroboram com os resultados revelados por De Toledo et al.,⁷¹ que avaliou o efeito antifúngico do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) em diferentes cepas padrão e clínicas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*), encontrando uma faixa de valores semelhantes de CIM/CFM que variaram entre 250–1000 µg/mL. De acordo com a literatura, a atividade antifúngica dos produtos é considerada ativa ou inativa, conforme os seguintes valores de CIM: 50-500 µg/mL, atividade forte/ótima; 600-1500 µg/mL, atividade moderada; acima de 1500 µg/mL, atividade fraca ou produto inativo.⁷²⁻⁷⁴ Assim, de acordo com esses dados supracitados, tanto a emulsão quanto a nanoemulsão de citronela apresentaram atividade antifúngica forte ou ótima de CIM.

Foi possível observar no presente estudo que os valores de CIM obtidos com o uso da nanoemulsão de citronela (0,156-0,312 mg/mL), foram semelhantes à de outro estudo⁵² em que se observou o efeito antimicrobiano e antibiofilme de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, em comparação com o óleo em sua forma pura. O óleo puro apresentou atividade contra *C. albicans* na concentração de 1220 µg/mL, e a nanoemulsão na concentração de 280 µg/mL, enquanto as nanoemulsões em branco, sem a presença do óleo essencial, não apresentaram atividade antimicrobiana, assim como os resultados observados no presente estudo. Os autores concluíram que o nanoencapsulamento do óleo melhorou a capacidade antimicrobiana do fitoterápico testado. Estes resultados podem ser justificados devido ao pequeno tamanho das partículas da nanoemulsão, que possibilita uma maior área superficial específica, permitindo uma maior interação do tratamento com a célula microbiana⁷⁵, e o aumento da atividade antimicrobiana das nanoemulsões pode estar relacionada com uma possível proteção contra a volatilização e degradação do óleo.⁵²

O uso da nanotecnologia como alternativa para melhorar a atividade antifúngica de produtos naturais tem se mostrado promissora. Gaspar de Toledo et al⁷⁶ avaliaram *in vitro* e *in vivo* a atividade do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* incorporados em um sistema de microemulsão em espécies fúngicas de *Candida albicans* ATCC e uma cepa clínica de candidíase vaginal. Os valores encontrados de CIM para a microemulsão de citronela foram de 31,2 µg/mL contra a espécie de *Candida* ATCC e de 62,5 µg/mL para a cepa clínica. Também foi relatado que a solução em branco de microemulsão de citronela não interferiu no crescimento do fungo e não apresentou atividade antifúngica, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Emulsões de óleo em água são amplamente utilizadas em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos. O contato das gotículas de óleo essencial com a água é energeticamente desfavorável. Porém, com o uso de agentes emulsificantes, há uma permissão de estabilização do óleo e uma dispersão favorável.^{77,78} Para a formulação da emulsão de citronela, investigada no presente estudo, foi utilizada goma xantana, um polissacarídeo produzido por *Xanthomonas campestris*, emulsificante e estabilizante à base de água muito utilizado na indústria alimentícia, apresentando uma boa estabilidade sobre diferentes faixas de temperatura e pH.⁷⁹⁻⁸¹ A emulsão de citronela diluída em goma xantana demonstrou resultados satisfatórios e boa ação antifúngica e antibiofilme, permitindo uma maior estabilidade do óleo e preservando seu potencial efeito.

Um estudo realizado por Riquelme et al.⁸² teve como objetivo analisar o comportamento de diferentes sistemas de emulsões com diferentes tamanhos de partículas (nanoemulsões e emulsões) quando submetidas à simulação de condições orais, com influência da saliva, pH e temperatura, em suas propriedades físicas e reológicas. Um dos agentes espessantes investigados no estudo foi a goma xantana. Foi observado que o uso desse emulsificante manteve o tamanho das partículas estáveis durante a simulação *in vitro* devido à formação de uma rede estruturada que manteve as gotículas de óleo resistentes a coalescência sob condições orais.

A outra hipótese deste estudo de que as formulações inibiriam o crescimento das espécies de *Candida* em amostras de RAAT foi aceita, comprovando o efeito antibiofilme das formulações à base de citronela. Ficou evidente nos resultados encontrados que ambas as formulações testadas, tanto a nanoemulsão quanto emulsão, reduziram a contagem de Log UFC/mL nos biofilmes mistos formados. A maior atividade antifúngica ocorreu para o grupo

de emulsão de citronela a 5mg/mL no tempo experimental de 30 minutos, reduzindo a contagem de biofilme em 45,09%, seguido da solução de nanoemulsão de citronela a 5mg/mL, que apresentou redução de aproximadamente 34,94%. Em um estudo realizado por Choonharuangdej et al⁸³ foi avaliada a eficácia do óleo essencial de *cinnamon* (*Cinnamomum zeylanicum*) e *lemongrass* (*Cymbopogon citratus*) em biofilmes de *Candida albicans* em superfícies de resinas acrílicas. Os autores concluíram que os óleos testados são capazes de eliminar e restringir a formação do fungo sobre as amostras, e que os efeitos dependeram da dose e do tempo de exposição. Estas informações corroboram com os achados no presente estudo, em que foi possível observar resultados mais eficazes no tempo de 30 minutos de exposição aos fitoterápicos.

A atividade antifúngica da planta *Cymbopogon nardus* acontece pela presença de alguns princípios ativos, como os monoterpenos (citronelal, nerol, geraniol e citronelol), constituintes do óleo de citronela. Estes princípios possuem eficácia evidenciada em estudos prévios da literatura.^{43,47,71} É relatado que o mecanismo de ação desses compostos ocorra pelo aumento da fluidez e permeabilidade da membrana dos microrganismos, induzindo distúrbios ou lise celular.⁸⁴ Estudos evidenciam a ação e eficácia do geraniol e citronelal em espécies de *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, justificando a alta efetividade das soluções à base de citronela neste estudo.^{45,46,85} Assim, os monoterpenos encontrados no óleo de citronela possivelmente causaram alterações na membrana dos fungos investigados, reduzindo sua proliferação.

A hipótese de que as formulações de citronela não apresentariam toxicidade para as células foi aceita. Ficou evidente observando-se os resultados do presente estudo de que as soluções investigadas não apresentaram comportamento citotóxico para células epiteliais da linhagem HaCat utilizando as concentrações de 5mg/mL, sendo este fato importante para complementar os resultados de efetividade antifúngica e antibiofilme destas soluções. Estudos *in vitro* publicados na literatura relatam que o uso de soluções nanoparticuladas na presença de óleos essenciais proporcionam uma maior viabilidade celular quando comparadas ao óleo puro,⁸⁶⁻⁸⁸ resultados que corroboram com o presente estudo, em que os valores de viabilidade celular situaram-se acima de 70%. Vale ressaltar que simulou-se o contato da prótese com a mucosa após a remoção da mesma da solução desinfetante, ou seja, apresentando apenas umidade ou poucos resíduos das soluções em sua superfície.

A solução de clorexidina a 0,12% utilizada no ensaio de citotoxicidade como controle, apresentou valores inferiores de viabilidade celular quando comparadas às demais soluções fitoterápicas. Resultados semelhantes foram relatados na literatura, demonstrando seu efeito citotóxico *in vitro*, não apenas em células epiteliais, como também em fibroblastos e células de ligamento periodontal.⁸⁹ Mesmo apresentando efeitos tóxicos, a clorexidina é uma das soluções comerciais mais empregadas para realização de bochechos e também como solução desinfetante de próteses, podendo neste caso, ser utilizada uma concentração mais alta ainda (2%), sendo considerada padrão ouro na Odontologia.^{46,90,91}

Estas observações são particularmente importantes devido ao aumento da incidência de infecções orais, especialmente por outras espécies de *Candida*, como a *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*, que são resistentes a agentes antifúngicos.⁹² Além deste fato, as soluções desinfetantes comercialmente disponíveis, como o hipoclorito de sódio e a própria clorexidina, causam alterações nas propriedades dos materiais odontológicos, como descoloração e manchamento.³⁷ Por estas razões, o estudo das propriedades das soluções fitoterápicas naturais é promissor para a prevenção da estomatite relacionada com próteses dentárias, representando um método alternativo em reduzir a colonização por *Candida* em materiais protéticos. Embora o enfoque deste estudo tenha sido sobre soluções desinfetantes extraorais, muitas outras possibilidades de uso destas formulações poderão ser investigadas a partir desses resultados, como por exemplo, em soluções enxaguatórias ou antissépticos bucais, géis mucoadesivos, pomadas antifúngicas, etc. Estudos futuros ainda serão necessários no sentido de otimizar o efeito antimicrobiano das formulações à base do óleo essencial de citronela, por meio do sinergismo com outros extratos naturais e/ou compostos sintéticos ou aumentando-se a concentração dos princípios ativos.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, concluiu-se que as formulações à base de citronela apresentaram efeito antifúngico sobre o crescimento de diferentes espécies de *Candida* em superfície de resina acrílica para próteses dentárias, e não apresentaram efeito citotóxico sobre células da linhagem epitelial.

REFERÊNCIAS

- 1- Petersen PE, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:81-92.
- 2- Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S, et al. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont* 2012;22:13-22.
- 3- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:e139-143.
- 4- Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* 1999;78:857-68.
- 5- Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, Fernandes MH, Scully C. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology* 2012;29:e348-56.
- 6- Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011;3:1–11.
- 7- Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010;98:15–25.
- 8- Oliver RJ, Dhaliwal HS, Theaker ED, Pemberton MN. Patterns of antifungal prescribing in general dental practice. *Br Dent J* 2004;196:701-3.
- 9-Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M. et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2676-84.
- 10- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:133-63.
- 11- Berretta AA, de Castro PA, Cavaleiro AH, Fortes VS, Bom VP, Nascimento AP. et al. Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013:641480.
- 12- Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002;29:1115-9.
- 13- Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007;52:1200-8.
- 14- Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis: a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37:107-14.
- 15- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* 1998;43:45-50.

- 16- Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:359-83.
- 17- Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:51-9.
- 18- Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:377-83.
- 19- Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. *Nurs Times* 2003;99:52-3.
- 20- Sims CR, Ostrosky-zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res* 2005;36:660–71.
- 21- Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: A review. *Clin Interv Aging* 2013;8:1199–1208.
- 22- Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008;14:582-90.
- 23- Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:112–22.
- 24- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;83:5385–94.
- 25- Cochis A, Fracchia L, Martinotti MG, Rimondini L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113:755-61.
- 26- Baillie GS, Douglas LJ. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol* 1999;310:644-56.
- 27- Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *J Appl Oral Sci* 2012;20:70-5.
- 28- Jenkinson HF, Douglas LJ. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial diseases* 2002;357-73.
- 29- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002;70:878-88.
- 30-Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:673-688.
- 31- de Figueiredo Freitas LS, Rossoni RD, Jorge AOC, Junqueira JC. Repeated applications of photodynamic therapy on *Candida glabrata* biofilms formed in acrylic resin polymerized. *Lasers Med Sci* 2017;32:549-555.

- 32- Vale-Silva LA, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2015;15:fov025.
- 33- Gonçalves LM, Madeira PLB, Diniz RS, Nonato RF, de Siqueira FSF, de Sousa EM, et al. Effect of *Terminalia catappa* Linn. on Biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata* and on Changes in Color and Roughness of Acrylic Resin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019;2019:7481341.
- 34- Berchier CE, Slot DE, Van der weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2010;37:829–39.
- 35- da Costa LFNP, Amaral CDSF, Barbirato DDS, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2017;148:308-18.
- 36- Paranhos RM, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci* 2007;15:33-8.
- 37- Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC. et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2013;30:276-82.
- 38- Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology* 2013;30:32-9.
- 39- Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 2002;27:73-80.
- 40- Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav* 2001;74:85-99.
- 41- Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med* 2016;37:1594-600.
- 42- Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
- 43- Nakahara K, Alzoreky N, Yoshihashi T, Nguyen H, Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (*Citronella* grass). *Japan Agricultural Research Quarterly* 2003;37:249–52.
- 44- Pereira Fde O, Mendes JM, Lima IO, Mota KS, Oliveira WA, Lima Ede O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm Biol* 2015;53:228–34.

- 45- Singh S, Fatima Z, Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49:465–72.
- 46- Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Araguê Catanoze I, Dos Santos DM. et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Arch Oral Biol* 2020;109:1-10.
- 47- Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 2015;22:657-65.
- 48- Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 2009;4:29-34.
- 49- Guiotti AM, Cunha BG, Paulini MB, Goiato MC, Dos Santos DM, Duque C. et al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *J Prosthet Dent* 2016;116:136-43.
- 50- Guiotti AM, Goiato MC, Dos Santos DM, Vechiato-Filho AJ, Cunha BG, Paulini MB. et al. Comparison of conventional and plant-extract disinfectant solutions on the hardness and color stability of a maxillofacial elastomer after artificial aging. *J Prosthet Dent* 2016;115:501-8.
- 51- Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, Da Silva CB, Pohlmann AR. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quím Nova* 2011;34:968-72.
- 52- da Silva Gündel S, de Souza ME, Quatrin PM, Klein B, Wagner R, Gündel A. et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. *Microb Pathog* 2018;118:268-76.
- 53- Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J Pharm Sci* 2007;96:2547-65.
- 54- Sadurní N, Solans C, Azemar N, García-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 2005;26:438-45.
- 55- McClements DJ. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 2011;7:2297-2316.
- 56-Solè I, Maestro A, Gonzalez C, Solans C, Gutiérrez JM. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir* 2006;22:8326-32.
- 57- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2005;10:102–10.
- 58- Holmberg K, Joësson B, Kronberg B, Lindman B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd: Chichester UK; 2002.

- 59- Pooja D, Panyaram S, Kulhari H, Rachamalla SS, Sistla R. Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity. *Carbohydr polym* 2014;110:1–9.
- 60- Lamarra J, Calienni MN, Rivero S, Pinotti A. Electrospun nanofibers of poly(vinyl alcohol) and chitosan-based emulsions functionalized with cabreuva essential oil. *Int J Biol Macromol* 2020;160:307-18.
- 61- Duarte JL, Amado JRR, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Ferreira AM, Souto RNP. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online] 2015;25:189-92.
- 62- Mor A, HanI K, Nicolas PJ. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem* 1994;269:31635–41.
- 63- Catanoze IA, Cunha BG, Costa GQ, Freitas da Silva EV, Duque C, Guiotti AM. Antagonistic effect of isolated and commercially available probiotics on the growth of *Candida albicans* on acrylic resin denture surfaces. *J Prosthet Dent* 2020;127:338-344.
- 64- Amaya Arbeláez MI, Vergani CE, Barbugli PA, Pavarina AC, Sanitá PV, Jorge JH. Long-Term Effect of Daily Chemical Disinfection on Surface Topography and *Candida Albicans* Biofilm Formation on Denture Base and Reline Acrylic Resins. *Oral Health Prev Dent* 2020;18:999-1010.
- 65- Işeri U, Uludamar A, Ozkan YK. Effectiveness of different cleaning agents on the adherence of *Candida albicans* to acrylic denture base resin. *Gerodontology* 2011;28:271-6.
- 66- Monteiro DR, Feresin LP, Arias LS, Barão VA, Barbosa DB, Delbem AC. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. *Med Mycol* 2015;53:656-65.
- 67- Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* 2003;111:465-71.
- 68- Kreling PF, Aida KL, Massunari L, Caiaffa KS, Percinoto C, Bedran TB. et al. Cytotoxicity and the effect of cationic peptide fragments against cariogenic bacteria under planktonic and biofilm conditions. *Biofouling* 2016;32:995-1006.
- 69- Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One* 2014;9:e106766.
- 70- Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig* 2015;19:2223-31.
- 71- De Toledo LG, Ramos MA, Spósito L, Castilho EM, Pavan FR, Lopes Éde O. et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *Int J Mol Sci* 2016;17:1252.

- 72- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:1027-31.
- 73- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004;35:275-80.
- 74- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem* 2001;49:4168-70.
- 75- Salem W, Leitner DR, Zingl FG, Schratter G, Prassl R, Goessler W. et al. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol* 2015;305:85–95.
- 76- Gaspar de Toledo L, Dos Santos Ramos MA, Bento da Silva P, Rodero CF, de Sá Gomes V, Noronha da Silva A. et al. Improved in vitro and in vivo Anti-*Candida albicans* Activity of *Cymbopogon nardus* Essential Oil by Its Incorporation into a Microemulsion System. *Int J Nanomedicine* 2020;15:10481-97.
- 77- Tadros, TF. Emulsion science and technology: A general introduction. *Emulsion Science and Technology* 2009;1–56.
- 78- Fantou C, Comesse S, Renou F, Grisel M. Hydrophobically modified xanthan: Thickening and surface active agent for highly stable oil in water emulsions. *Carbohydr Polym* 2019;205:362-70.
- 79- Espert M, Salvador A, Sanz T. Rheological and microstructural behaviour of xanthan gum and xanthan gum-Tween 80 emulsions during in vitro digestion. *Food Hydrocoll* 2019;95:454–61.
- 80- Fu D, Deng S, McClements DJ, Zhou L, Zou L, Yiet J. et al. Encapsulation of β -carotene in wheat gluten nanoparticle-xanthan gum-stabilized Pickering emulsions: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Food Hydrocoll* 2019;89:80–9.
- 81- Riquelme N, Robert P, Troncoso E, Arancibia C. Influence of the particle size and hydrocolloid type on lipid digestion of thickened emulsions. *Food Funct* 2020;11:5955-64.
- 82- Riquelme N, Laguna L, Tárrega A, Robert P, Arancibia C. Oral behavior of emulsified systems with different particle size and thickening agents under simulated conditions. *Food Res Int* 2021;147:110558.
- 83- Choonharuangdej S, Srithavaj T, Thummawanit S. Fungicidal and inhibitory efficacy of cinnamon and lemongrass essential oils on *Candida albicans* biofilm established on acrylic resin: An in vitro study. *J Prosthet Dent* 2021;125:707.e1-707.e6.
- 84- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 2007;55:4863-70.
- 85- Singh S, Fatima Z, Hameed S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch Microbiol* 2016;198:459-472.

- 86- Almeida KB, Ramos AS, Nunes JBB, Silva BO, Ferraz ERA, Fernandes AS, et al. PLGA nanoparticles optimized by Box-Behnken for efficient encapsulation of therapeutic *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;181:935-42.
- 87- Chen F, Shi Z, Neoh KG, Kang ET. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnol Bioeng* 2009;104:30-9.
- 88- Almeida KB, Araujo JL, Cavalcanti JF, Romanos MTV, Mourão SC, Amaral ACF, et al. In vitro release and anti-herpetic activity of *Cymbopogon citratus* volatile oil-loaded nanogel. *Rev Bras Farm* 2018;28:495-502.
- 89 - Müller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *Biomed Res Int* 2017;2017:4019723.
- 90- Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;234:256-65.
- 91- Tsourounakis I, Palaiologou-Gallis AA, Stoute D, Maney P, Lallier TE. Effect of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. *J Periodontol* 2013;84:1211-20.
- 92- Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res* 2009;88:105-115.

TABELAS

Tabela 1 - Valores de CIM e CFM obtidos para as soluções fitoterápicas.

Espécies de <i>Candida</i>	Nanoemulsão de citronela		Emulsão de citronela	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> (ATCC 26790)	0,312 mg/mL	0,625 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
<i>C. albicans</i> – (oral - 6892)	0,312 mg/mL	0,625 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL
<i>C. albicans</i> – (oral - 7037)	0,312 mg/mL	0,625 mg/mL	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL
<i>C. glabrata</i> (ATCC 2001)	0,156 mg/mL	0,312 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL

Tabela 2 - Valores médios (desvio padrão) da contagem de biofilme misto em Log (UFC/mL) nas amostras de RAAT, após imersão nas formulações desinfetantes, nos diferentes tempos.

GRUPOS	15 minutos		30 minutos	
	Log (UFC/mL) Média/DP	Redução em Log (%)*	Log (UFC/mL) Média/DP	Redução em Log (%)*
GI- Controle Negativo (Biofilme misto)	6,28 / (0,12) ^{AB, a}	-	6,01/ (0,55) ^{AB, a}	-
GII- Nanoemulsão de Citronela a 5mg/mL	4,22 / (0,56) ^{C, a}	2,06 (32,80%)	3,91/ (0,45) ^{C, a}	2,10 (34,94%)
GIII- Controle da Nanoemulsão	6,48 / (0,12) ^{A, a}	-	6,44/ (0,10) ^{A, a}	-
GIV- Emulsão de Citronela a 5mg/mL	4,33/ (0,36) ^{C, a}	1,95 (31,50%)	3,30/ (0,38) ^{C, b}	2,71 (45,09%)
GV- Controle da Emulsão	5,66/ (0,48) ^{B, a}	-	5,52/ (0,28) ^{B, a}	-
GVI- Controle Positivo (CHX 0.12%)	0,01/ (0,01) ^{D, a}	6,27 (100%)	0,01/ (0,01) ^{D, a}	6,00 (100%)

Nota: Letras maiúsculas diferentes na coluna mostram diferença entre os grupos e letras minúsculas na linha mostram diferença entre os tempos de imersão, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

** % de redução em relação à média do controle negativo*

FIGURAS

Figura 1 – Amostras de RAAT posicionadas na placa de 24 poços em contato com as formulações de tratamento após a formação do biofilme misto.

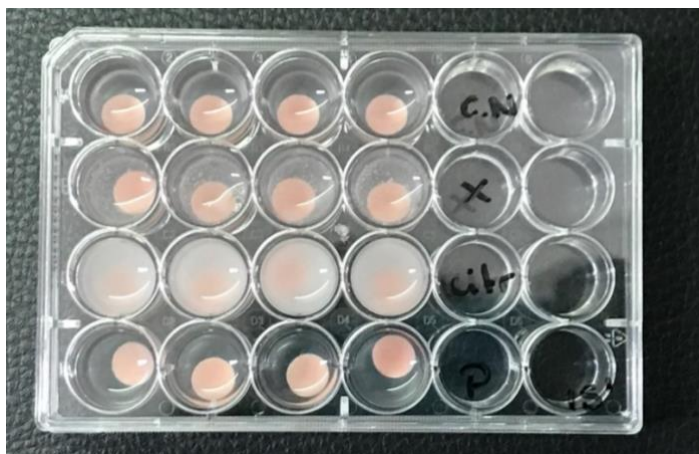


Figura 2 – Amostras de RAAT posicionadas na placa de 24 poços para serem submetidas ao ensaio de viabilidade celular e às diluições seriadas.

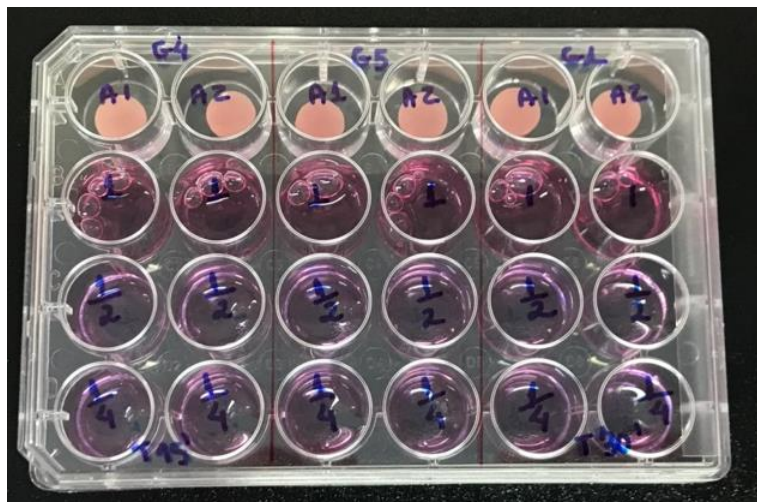
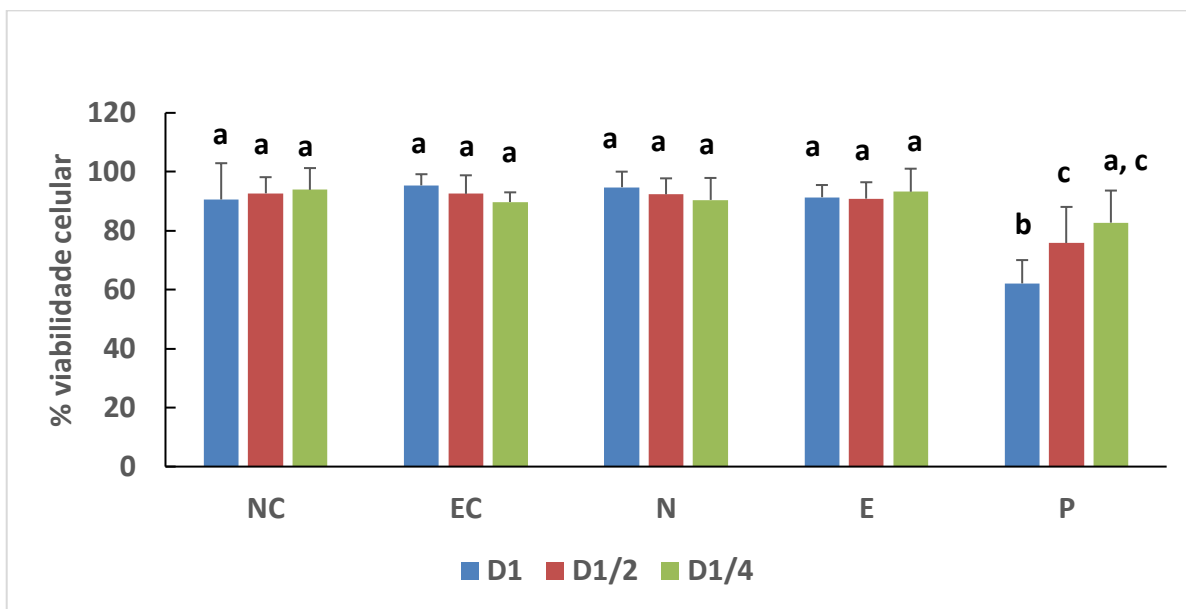


Figura 3 - Gráfico da viabilidade das células epiteliais (HaCat) após exposição às diluições seriadas das formulações. NC: Nanoemulsão de citronela a 5mg/mL, EC: Emulsão de citronela a 5mg/mL, N: Controle nanoemulsão, E: Controle emulsão, P: Periogard.



Nota: As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$).

Capítulo 2

Avaliação *in vitro* de formulações do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) em propriedades físicas e mecânicas de resina acrílica para prótese dentária.

RESUMO

Declaração do problema. A higiene de próteses dentárias é de suma importância para a longevidade do tratamento reabilitador e manutenção da saúde oral. Alguns produtos disponíveis comercialmente acarretam efeitos adversos aos materiais e ao próprio usuário, fazendo da fitoterapia uma alternativa a ser pesquisada.

Objetivo. Avaliar a ação de diferentes formulações à base de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) a 5 mg/mL na alteração de propriedades físicas e mecânicas de resina acrílica ativada termicamente (RAAT) para base protética.

Materiais e Métodos. As amostras de RAAT foram divididas em 5 grupos de amostras circulares (n=10) e 5 grupos de amostras retangulares (n=10), de acordo com a solução utilizada: GI – controle (água destilada) sem imersão; GII – saliva artificial; GIII – nanoemulsão de citronela a 5mg/mL; GIV - emulsão de citronela a 5mg/mL e GV - Clorexidina 0,12% (Periogard). As amostras foram imersas nas respectivas formulações, simulando a desinfecção de próteses dentárias pelo período de 30 minutos diários, durante 6 meses. Após este período, foi feita a análise da alteração de superfície (Ra), da estabilidade de cor (CIEDE 2000), avaliação da microdureza Knoop, resistência à flexão (MPa), módulo de elasticidade (MPa), força máxima (N) e alongamento (%) das amostras. Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas ($\alpha=.05$).

Resultados. Não houve diferença nos valores médios de rugosidade de superfície (Ra - μm) entre os grupos após serem submetidos à imersão nas formulações testes, com exceção do grupo controle, que apresentou diferença estatística significativa na rugosidade de superfície após o período de imersão. Para a microdureza Knoop houve diferença estatística significativa apenas entre o grupo controle e o grupo emulsão de citronela. Para os dados de alteração de cor (ΔE_{00}), resistência flexural, módulo de elasticidade, força máxima e alongamento não houve diferença estatística significativa entre os grupos após o processo de imersão.

Conclusão. Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que as formulações fitoterápicas à base de citronela são seguras, no que se refere às propriedades físicas e mecânicas estudadas, podendo serem indicadas como soluções desinfetantes extraorais para próteses dentárias.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Este estudo comprovou a segurança de formulações à base de óleo de citronela no que diz respeito às propriedades físicas e mecânicas de resina acrílica ativada termicamente para confecção de próteses dentárias. Diante dos resultados favoráveis observados, estas formulações fitoterápicas poderiam ser uma alternativa de princípio ativo em soluções desinfetantes para higienização de próteses dentárias e controle de biofilme.

Palavras-chave: Teste de materiais, propriedades físicas, prótese total, resinas acrílicas, desinfecção, *Cymbopogon*.

INTRODUÇÃO

É fato que o uso de próteses dentárias favorece a retenção de biofilme e o desenvolvimento de infecções. Em virtude de o processo de envelhecimento acarretar alterações fisiológicas (senescência) e ser agravado por certas condições patológicas predisponentes (senilidade), os idosos tendem a perder a capacidade funcional para as atividades diárias, sendo a higiene bucal uma delas. O controle de formação de biofilme é muito importante para manter a saúde geral e da cavidade oral dos usuários de próteses. Isto deve ser promovido por meio de técnicas diárias de higienização, realizadas pelo próprio paciente. Essa rotina de higiene deve ser realizada por meio de técnicas de limpeza mecânica intraoral e extraoral, por meio de enxaguatórios bucais e soluções desinfetantes com produtos químicos, técnicas essas que se complementam. Dentre as soluções químicas comercialmente disponíveis, tanto para uso intraoral quanto extraoral, destaca-se a solução de clorexidina, devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, impedindo a proliferação de microrganismos.^{1,2} Entretanto, o uso da clorexidina tem que ser indicado com cautela, visto que existem efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento de dentes artificiais e os materiais da base da prótese,³⁻⁵ alteração do paladar,^{6,7} citotoxicidade,⁸ além de descamação da mucosa oral.⁹ Dessa forma, a busca por métodos alternativos de desinfecção, com soluções que não alterem as propriedades do material e que sejam inertes para o seu usuário torna-se essencial.

Assim, é desejável promover a saúde por meio de terapias naturais ou alternativas, tais como a utilização de fitoterápicos. A fitoterapia, destaca-se como alternativa em potencial a ser pesquisada, dada a sua aplicabilidade na Odontologia. A planta conhecida como citronela (*Cymbopogon nardus*) é utilizada para a extração de óleo essencial, muito utilizado como repelente de insetos, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, o citronelol e o nerol, que são antissépticos, daí seu extenso uso em sabões e desinfetantes domésticos.¹⁰⁻¹³ Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa eficácia antimicrobiana^{10,14,15} e baixa citotoxicidade em certas concentrações.¹³ Estudos também comprovaram seu uso como agente desinfetante de próteses buco-maxilo-faciais.^{16,17} Nesse sentido, a citronela é considerada uma planta de ação antibacteriana e antifúngica potencial, abrindo novas perspectivas de controle de infecção humana.

A base acrílica de próteses dentárias deve apresentar alguns requisitos básicos, como propriedades mecânicas adequadas, estética satisfatória, permitir correta higienização e ser de fácil manuseio para o paciente. Além disso, os materiais utilizados para a sua confecção, como a resina acrílica ou polimetilmetacrilato (PMMA), devem apresentar resistência para suportar

forças geradas durante a utilização e serem estáveis sob condições variáveis, como o uso de soluções desinfetantes para higienização.¹⁸ Embora estudos na literatura demonstrem que soluções químicas de desinfecção de próteses dentárias sejam eficazes contra algumas espécies, como a *Candida albicans* e contra a formação de biofilme, o uso diário destas soluções pode influenciar nas propriedades físicas e mecânicas da resina acrílica. Assim, é essencial buscar uma solução que não acarrete danos severos a este material.^{19,20}

Visto que uma solução ideal de higienização para próteses dentárias deve apresentar algumas características como biocompatibilidade, ação antimicrobiana, não apresentar efeito tóxico e ser de fácil utilização,²¹ percebe-se a necessidade da realização de estudos que investiguem a ação das soluções fitoterápicas à base de citronela na alteração das propriedades físicas e mecânicas de resina acrílica utilizada na confecção de próteses. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de diferentes formulações à base do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) a 5 mg/mL na alteração de propriedades físicas e mecânicas de resina acrílica que constitui a base protética destas próteses. A hipótese deste estudo foi a de que as soluções à base de citronela não promoveriam danos superiores às propriedades da RAAT, em comparação à uma solução comercial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Confecção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)^{13,22}

Foram confeccionadas um total de 50 amostras circulares e 50 amostras retangulares de RAAT (VipiCril Plus; VIPI Produtos Odontológicos). Para as amostras circulares, utilizou-se uma matriz metálica vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada (n=10). Para as amostras retangulares, utilizou-se uma matriz metálica com dimensões de 60x12x3 mm (n=10). Após a inclusão em mufla e manipulação da RAAT, a mesma foi polimerizada pelo método convencional, de acordo com o fabricante. Em seguida as amostras foram submetidas ao polimento em uma politriz universal semiautomática (Arotec S.A. Ind Com), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (#400, #600, #800 e #1200; Buehler), sendo finalizadas com solução diamantada em disco de feltro. Em seguida foi realizada a padronização da espessura das amostras numa faixa de 3 mm para as amostras circulares e 3,3 mm para as retangulares, utilizando a lixa de granulação 400 com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda). Por fim, as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Ultracleaner

1400; UNIQUE) por 20 min em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem (ANEXO D).

Preparo das formulações à base de citronela

Por meio de resultados dos ensaios microbiológicos prévios (Concentração Fungicida Mínima - CFM), foi padronizada uma concentração de 5 mg/mL (10x CFM) para as soluções fitoterápicas de nanoemulsão de citronela e emulsão de citronela para os testes físicos e mecânicos descritos a seguir, visto ter sido uma concentração efetiva em eliminar espécies fúngicas do gênero *Candida* comumente presentes no ambiente oral.

Imersão das amostras nas formulações

As amostras foram divididas em 5 grupos de amostras circulares (n=10) e 5 grupos de amostras retangulares (n=10), de acordo com a formulação utilizada (Quadro 1). As amostras foram posicionadas em recipientes com tampa e imersas nas respectivas formulações, em temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), simulando a desinfecção de próteses dentárias pelo período de 30 minutos diários, durante 6 meses. Para isso, 5400 minutos de imersão corresponderam aos 6 meses de desinfecção diária.^{23,24} O grupo saliva artificial, adquirida através de farmácia de manipulação, foi mantido em estufa bacteriológica digital (CIENLAB Equipamentos Científicos LTDA) a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. As soluções foram trocadas a cada 24 horas.

Análise da alteração de superfície

As amostras de RAAT tiveram sua rugosidade de superfície (R_a - μm) mensurada por meio de um rugosímetro (Mitutoyo SJ-400; Mitutoyo Corp.), sendo considerada a faixa de 0,02 a 0,05 μm , ideal no período inicial. As amostras de RAAT foram posicionadas individualmente no rugosímetro com a superfície submetida à análise sempre voltada para cima, sendo executadas três leituras paralelas para mensurar a rugosidade de superfície (R_a) inicial. A extensão de cada leitura foi de 2,4 mm, com cut-off de 0,8 mm.^{25,26} A velocidade da leitura foi de 0,5mm/seg. Os valores de rugosidade iniciais foram obtidos pela média aritmética e dados em micrometros. Novas leituras foram realizadas após a imersão nas formulações, a fim de verificar se as mesmas teriam um potencial de alteração da superfície das amostras de RAAT.

Análise da estabilidade de cor

Os dados de estabilidade de cor foram avaliados utilizando um aparelho espectrofotômetro (UV-2450; Shimadzu, Kyoto, Japão). As leituras foram realizadas utilizando a escala de cor CIE $L^*a^*b^*$ (*Commission Internationale de l'Eclairage*),²⁷ usando um iluminante D65 em um ângulo de 2° de observação com uma faixa de comprimento de onda de 380 a 780 nm e uma abertura de 10 mm de diâmetro. A diferença cromática foi calculada utilizando o sistema CIEDE 2000 (ΔE_{00}) por meio da fórmula:

$$\Delta E_{00} = \left[\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L} \right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C} \right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H} \right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C} \right) \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

O ΔL , ΔC e ΔH são as diferenças de luminosidade (L), croma (C) e matiz (H), respectivamente, enquanto K são os fatores paramétricos de visualização e S são as funções de passagem. Quanto maior o valor do ΔE_{00} , maior a alteração de cor do material.²⁸

Avaliação da microdureza

Para o ensaio de microdureza Knoop foram utilizadas 10 amostras circulares para cada grupo. A microdureza foi avaliada utilizando-se microdurômetro (Shimadzu HMV-2000; Shimadzu Corporation), equipado com um diamante Knoop, sob uma carga de 25g por 10s. Um único operador mediu a maior diagonal de cada marcação, e a média das 3 indentações foi definida como o valor de microdureza (KHN, Kg/mm²) da amostra, mantendo uma distância de cerca de 1 mm entre cada leitura, e um valor médio foi calculado.^{29,30}

Resistência à flexão e módulo de elasticidade

Para o ensaio de resistência à flexão e módulo de elasticidade, foram utilizadas 50 amostras retangulares com dimensões de acordo com a ISO 4049:2009.³¹ As amostras foram armazenadas em água destilada a 37 °C por 24 h, antes dos testes. Foi utilizado o teste de flexão de três pontos, cada amostra foi suportada por dois cilindros inferiores distantes 50 mm entre si. Uma célula de carga de 100 kg/F foi utilizada para aplicação de carga constante no centro da amostra, a uma velocidade de 0,5 mm/minuto em uma máquina de ensaios (DL2000; EMIC)

até a fratura das amostras, seguindo os parâmetros estabelecidos pela norma da ADA, especificação nº 27. O momento da fratura foi designado como o momento em que a carga aplicada caiu a zero. Os dados foram registrados por meio de um programa de software (Tesc; Intermetric Ltd). A resistência à flexão foi calculada em MegaPascal (MPa), a partir da seguinte equação:

$$\sigma = \frac{3Fl}{2bh^2}$$

onde F é a carga máxima exercida na amostra (N), l é a distância (mm) entre os suportes, b é a largura (mm) da amostra, e h é a altura (mm) da amostra medida com um paquímetro digital imediatamente antes do teste. O módulo de elasticidade foi calculado com base nas curvas de deflexão de carga registradas.³² Os valores de alongamento foram obtidos em porcentagem (%).

Forma de análise dos dados

Os dados obtidos no teste de rugosidade passaram nos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade, sendo então submetidos à análise de variância (ANOVA) a dois fatores, com medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey-Kramer para comparações individuais. Os dados de resistência flexural, módulo de elasticidade, força máxima e alongamento passaram nos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade, e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a um fator, seguida pelo teste de Tukey-Kramer para comparações individuais. Os dados de alteração de cor (ΔE_{00}) não passaram nos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade, e foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações individuais. Os dados de microdureza Knoop passaram no teste de normalidade (Shapiro-Wilk), mas não passaram no teste de homogeneidade, e foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações individuais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot (version 12.0; Systat Software Inc.), adotando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão descritos os valores médios (DP) do efeito das diferentes soluções de imersão nas propriedades físicas e mecânicas das amostras de RAAT.

Para a rugosidade de superfície (R_a - μm) é possível observar que não houve diferença entre os grupos após serem submetidos à imersão nas formulações testes, com exceção do grupo controle (0,045 μm), que apresentou diferença estatística significativa na rugosidade de superfície após o período de imersão (0,032 μm). Além disso, houve diferença estatística nos valores de rugosidade final, entre os grupos que receberam as soluções testes, em comparação com o grupo controle em água destilada (0,032 μm) e o grupo saliva artificial (0,032 μm).

Observando-se os valores de alteração de cor (ΔE_{00}), é possível observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais após serem submetidos à imersão nas formulações testes ($p=.075$). Os menores valores médios de ΔE_{00} encontrados foram para os grupos da nanoemulsão de citronela (1,82), seguido do grupo saliva artificial (1,91). Os maiores valores médios de ΔE_{00} , quando comparados ao grupo controle (2,10), foram observados no grupo emulsão de citronela (2,17) e grupo Periogard (2,07).

Para a microdureza Knoop houve diferença estatística significativa apenas entre o grupo controle (19,35) e o grupo emulsão de citronela (18,76), $p=.024$. Os demais grupos experimentais (saliva artificial, nanoemulsão de citronela, e Periogard) não apresentaram diferença significativa entre si e em relação ao grupo controle.

Para os dados de resistência flexural, módulo de elasticidade, força máxima e alongamento é possível observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos após o processo de imersão.

DISCUSSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos, a hipótese deste estudo de que as formulações à base de citronela não promoveriam danos superiores às propriedades do material testado, em comparação a uma solução comercial, foi aceita. Ficou evidente que, no que se refere às propriedades físicas e mecânicas, como cor, resistência flexural, módulo de elasticidade, porcentagem de alongamento e força máxima os valores médios foram semelhantes aos da solução comercial testada, sem diferença estatística. Foram observadas apenas algumas particularidades para os resultados de rugosidade de superfície e microdureza. Na literatura científica, não é possível encontrar um número considerável de estudos avaliando as propriedades físicas e mecânicas de materiais que foram submetidos à imersão em formulações com óleos essenciais, como o óleo de citronela, porém, existe uma gama de estudos que comprovam os efeitos adversos de soluções de imersão convencionais quando utilizadas para desinfecção de próteses dentárias à base de resina acrílica,^{20,23,33,34} justificando a busca por soluções alternativas.

A estrutura da superfície dos materiais que constituem as próteses e a composição química dos mesmos são fatores que influenciam a colonização microbiana. Dentre as propriedades necessárias destes materiais, aquelas relacionadas com a superfície, como a rugosidade, são de grande importância clínica, já que facilitam o acúmulo de biofilme e manchamento.³⁵ Conforme observado nos resultados do presente estudo, não houve diferença estatística significativa nos valores de rugosidade final de superfície das amostras, que foram submetidas à imersão nas formulações de nanoemulsão e emulsão de citronela. Resultados estes que corroboram com um estudo conduzido por Madeira et al,³⁶ que objetivou avaliar as propriedades da resina acrílica para próteses após serem submetidas à imersão em extrato de *lemongrass* (*Cymbopogon citratus*) pelo período de 0, 7, 14, 21, e 28 dias. Os autores verificaram que não houve nenhuma alteração significativa na rugosidade de superfície do material testado, comprovando a segurança e eficácia da solução neste requisito.

Além disso, foi possível verificar que houve diferença estatística significativa apenas nos valores de rugosidade de superfície em água destilada (grupo controle) antes e após a imersão. Isto pode estar relacionado com a absorção de água pela resina acrílica, afetando a resistência do polímero, reduzindo as forças entre as cadeias poliméricas, causando alteração das propriedades dimensionais e mecânicas através da formação de microfissuras.^{30,37} Resultados semelhantes foram encontrados por Heidrich et al,³⁸ que observaram uma alteração de rugosidade de superfície em resinas acrílicas para todas as soluções testadas no estudo, incluindo o grupo com água.

Estudos estabelecem valores de rugosidade (Ra) próximos ou inferiores a 0,2 μm , para dificultar a adesão microbiana.³⁹ De acordo com alguns autores, as técnicas convencionais de acabamento e polimento das bases acrílicas das próteses, dificilmente atingem níveis inferiores a estes valores.⁴⁰ Entretanto, observou-se neste estudo, nível de rugosidade média de 0,04 μm para as amostras de RAAT, antes da imersão nas soluções. Este valor está muito abaixo do valor crítico estabelecido pelos estudos ($Ra \geq 0,2 \mu\text{m}$). Mesmo após a imersão nas formulações, os valores de rugosidade permaneceram menores do que 0,2 μm , apresentando valores médios de 0,04 μm , independentemente da solução de imersão. Os materiais utilizados na confecção de próteses dentárias devem permanecer com a superfície lisa para evitar o acúmulo de biofilme, manchamento e degradação superficial. Uma superfície lisa é mais resistente à colonização por microrganismos.

Os valores de alteração de cor foram avaliados utilizando a fórmula ΔE_{00} , que é baseada nas coordenadas CIELab, no entanto, inclui não apenas funções de luminosidade, croma e matiz, mas um termo interativo entre diferenças de croma e matiz para refinar a análise para cores azuis e cinzas. Como parâmetro, foi definido o limite de perceptibilidade em $\Delta E_{00} \leq 1,30$, e o limite de aceitabilidade clínica de $\Delta E_{00} \leq 2,25$.^{27,28} Desta forma, observa-se que os resultados de ΔE_{00} obtidos para as soluções fitoterápicas testadas encontram-se dentro da aceitabilidade clínica, apresentando o valor de 1,82 para a solução de nanoemulsão de citronela e de 2,17 para a solução de emulsão de citronela, demonstrando a eficácia e segurança destas formulações. Além disso, não foi observada nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais, e todos os valores obtidos encontram-se classificados como perceptíveis e dentro da aceitabilidade clínica. Resultados semelhantes foram obtidos por Madeira et al,³⁶ que não verificaram alteração de cor visível quando realizada a imersão em uma solução à base de extrato de *lemongrass* (*Cymbopogon citratus*) em resina acrílica.

Estes achados são extremamente interessantes, visto que, as soluções químicas convencionais quando utilizadas em longo prazo, podem prejudicar a estética dos materiais.^{34,41} A estabilidade de cor da base protética é imprescindível para que a estética se mantenha ao longo do tempo e se consiga sucesso e longevidade da reabilitação oral.⁴² A alteração de cor de materiais restauradores estéticos, tais como as resinas compostas e resinas acrílicas é multifatorial, abrangendo fatores intrínsecos e extrínsecos (manchamento por alimentos, bebidas, cigarro, entre outros).^{43,44} Os fatores intrínsecos se relacionam às alterações internas do material, em sua matriz resinosa, ou ainda à oxidação de monômeros residuais e amins terciárias.⁴⁵

Em relação à microdureza Knoop, foi possível verificar que houve diferença estatística significativa apenas entre o grupo controle (19,35) e o grupo emulsão de citronela (18,76), observando uma pequena redução numérica da microdureza das amostras de resina acrílica após serem submetidas à imersão nesta formulação especificamente. Por outro lado, o valor das amostras submetidas à formulação de nanoemulsão de citronela se manteve estável (19,22), observando-se o mesmo para o grupo Periogard (19,11), sendo estes valores semelhantes e sem diferença estatística quando comparados ao grupo controle (19,35). De acordo com a literatura,⁴⁶ é possível que esta redução esteja associada a difusão do meio aquoso destas soluções através da resina, e resulte em uma alteração no material, diminuindo os valores de dureza. As soluções aquosas de desinfecção são absorvidas e atuam como plastificantes, sugerindo uma possível alteração da estrutura química das resinas acrílicas quando expostas a repetidos ciclos de desinfecção. A microdureza superficial fornece informações sobre a densidade do material e sua resistência ao desgaste. De acordo com as especificações da ANSI/ADA nº 12-200223 a dureza Knoop de resinas para base de dentaduras devem apresentar valores acima de 15 Kgf/mm² para evitar o desgaste excessivo do material, neste caso, nenhuma das soluções testadas promoveu alterações abaixo deste valor preconizado pela ANSI/ADA. Tendo em vista a eficácia destas soluções à base de citronela no controle de biofilme, os valores obtidos estarem dentro do aceitável e considerando os efeitos adversos causados pelas soluções químicas comerciais a longo prazo, incluindo sua ação na microdureza de superfície,^{46,47} justifica-se a indicação do uso das soluções fitoterápicas para esta finalidade.

De acordo com estudos presentes na literatura, é possível afirmar que soluções químicas de desinfecção podem afetar negativamente as propriedades de resistência mecânica de resinas acrílicas quando utilizados em longo prazo, diminuindo sua resistência flexural.⁴¹ Esta propriedade está fortemente relacionada com a longevidade clínica das próteses, por isso não deve ser significativamente influenciada pelos métodos de higienização, sendo que a diminuição da resistência à flexão pode resultar em maior incidência de fraturas.⁴⁸ No presente estudo, para a análise de resistência flexural, foi possível observar que não houve diferença estatística significativa. A norma estabelece que as resinas acrílicas não devem atingir menos de 65 MPa de resistência flexural.^{18,49} Com esse critério, todos os grupos avaliados neste estudo estão adequados para uso clínico. Resultados que corroboram com Anjum et al,²¹ que verificaram em seu estudo que o óleo essencial de tomilho não exerceu efeito adverso sobre a resistência flexural de resinas acrílicas para base protética, quando submetidas à imersão, simulando o período de 30 dias. Em outro estudo, citado anteriormente, que avaliou uma solução à base de extrato de *lemongrass* (*Cymbopogon citratus*),³⁶ foi verificado que a

resistência flexural da resina acrílica não foi alterada após os períodos de imersão na solução, de até 28 dias. Além da resistência flexural, as outras propriedades avaliadas no presente estudo, como módulo de elasticidade, força máxima e porcentagem de alongamento se mostraram estáveis e não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas ao grupo controle.

Estas observações supracitadas são particularmente importantes, devido ao aumento da incidência de infecções orais, e que as soluções desinfetantes comercialmente disponíveis, como o hipoclorito de sódio e clorexidina, causam alterações nas propriedades dos materiais odontológicos, como descoloração e manchamento.⁴ Por estas razões, a busca de informações sobre formulações fitoterápicas é promissor para a prevenção da estomatite relacionada com próteses dentárias, representando um método alternativo de desinfecção.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, concluiu-se que as formulações fitoterápicas à base de citronela são seguras, no que se refere às propriedades físicas e mecânicas estudadas, podendo serem indicadas como desinfetantes extraorais para próteses dentárias.

REFERÊNCIAS

- 1- Berchier CE, Slot DE, Van der weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2010;37:829–39.
- 2- da Costa LFNP, Amaral CDSF, Barbirato DDS, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2017;148:308-18.
- 3- Paranhos RM, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci* 2007;15:33-8.
- 4- Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC. et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2013;30:276-82.
- 5- Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology* 2013;30:32-9.
- 6- Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 2002;27:73-80.
- 7- Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav* 2001;74:85-99.
- 8- Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med* 2016;37:1594-600.
- 9- Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
- 10- Nakahara K, Alzoreky N, Yoshihashi T, Nguyen H, Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly* 2003;37:249–52.
- 11- Pereira Fde O, Mendes JM, Lima IO, Mota KS, Oliveira WA, Lima Ede O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm Biol* 2015;53:228–34.
- 12- Singh S, Fatima Z, Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49:465–72.
- 13- Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Araguê Catanoze I, Dos Santos DM. et al. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial

- mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Arch Oral Biol* 2020;109:1-10.
- 14- Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 2015;22:657-65.
- 15- Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 2009;4:29-34.
- 16- Guiotti AM, Cunha BG, Paulini MB, Goiato MC, Dos Santos DM, Duque C. et al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *J Prosthet Dent* 2016;116:136-43.
- 17- Guiotti AM, Goiato MC, Dos Santos DM, Vechiato-Filho AJ, Cunha BG, Paulini MB. et al. Comparison of conventional and plant-extract disinfectant solutions on the hardness and color stability of a maxillofacial elastomer after artificial aging. *J Prosthet Dent* 2016;115:501-8.
- 18- Aguirre BC, Chen JH, Kontogiorgos ED, Murchison DF, Nagy WW. Flexural strength of denture base acrylic resins processed by conventional and CAD-CAM methods. *J Prosthet Dent* 2020;123:641-6.
- 19- Nikawa H, Iwanaga H, Hamada T, Yuhta S. Effects of denture cleansers on direct soft denture lining materials. *J Prosthet Dent* 1994;72:657-62.
- 20- Salloum AM. Effect of 5.25 % sodium hypochlorite on color stability of acrylic and silicone based soft liners and a denture base acrylic resin. *J Indian Prosthodont Soc* 2014;14:179-86.
- 21- Anjum R, Dhaded SV, Joshi S, Sajjan CS, Konin P, Reddy Y. Effect of plant extract denture cleansing on heat-cured acrylic denture base resin: An in vitro study. *J Indian Prosthodont Soc* 2017;17:401-5.
- 22- Catanoze IA, Cunha BG, Costa GQ, Freitas da Silva EV, Duque C, Guiotti AM. Antagonistic effect of isolated and commercially available probiotics on the growth of *Candida albicans* on acrylic resin denture surfaces. *J Prosthet Dent* 2020;127:338-344.
- 23- Amaya Arbeláez MI, Vergani CE, Barbugli PA, Pavarina AC, Sanitá PV, Jorge JH. Long-Term Effect of Daily Chemical Disinfection on Surface Topography and *Candida Albicans* Biofilm Formation on Denture Base and Reline Acrylic Resins. *Oral Health Prev Dent* 2020;18:999-1010.
- 24- Işeri U, Uludamar A, Ozkan YK. Effectiveness of different cleaning agents on the adherence of *Candida albicans* to acrylic denture base resin. *Gerodontology* 2011;28:271-6.
- 25- Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a reline resin after long- term chemical disinfection and toothbrushing. *J Prosthet Dent* 2014;112:1523-9.
- 26- Consani RL, Folli BL, Nogueira MC, Correr AB, Mesquita MF. Effect of Polymerization Cycles on Gloss, Roughness, Hardness and Impact Strength of Acrylic Resins. *Braz Dent J* 2016;27:176-80.

- 27- Commission International de l'Eclairage. Technical report: colorimetry. CIE Publication. No. 153, Vienna, Austria: CIE Central Bureau; 2004.
- 28- Bitencourt SB, Kanda RY, de Freitas Jorge C, Barão VAR, Sukotjo C, Wee AG, Goiato MC, Pesqueira AA. Long-term stainability of interim prosthetic materials in acidic/staining solutions. *J Esthet Restor Dent*. 2020 Jan;32(1):73-80.
- 29- Rizzatti -Barbosa CM, Ribeiro-Dasilva MC. Influence of double flask investing and microwave heating on the superficial porosity, surface roughness, and knoop hardness of acrylic resin. *J Prosthodont* 2009;18:503-6.
- 30- Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Dekon SF. Effect of thermal cycling and disinfection on microhardness of acrylic resin denture base. *J Med Eng Technol* 2013;37:203-7.
- 31- International Organization for Standardization. ISO 4049:2009. Dentistry-resin based filling materials. ISO; 2009.
- 32- Goracci C, Cadenaro M, Fontanive L, Giangrosso G, Juloski J, Vichi A. et al. Polymerization efficiency and flexural strength of low-stress restorative composites. *Dent Mater* 2014; 30:688-94.
- 33- Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, de Souza RF, Lovato da Silva CH, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res* 2010;54:78-83.
- 34- Paranhos Hde F, Peracini A, Pisani MX, Oliveira Vde C, de Souza RF, Silva-Lovato CH. Color stability, surface roughness and flexural strength of an acrylic resin submitted to simulated overnight immersion in denture cleansers. *Braz Dent J* 2013;24:152-6.
- 35- Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont* 2000;13:136-40.
- 36- Madeira PL, Carvalho LT, Paschoal MA, de Sousa EM, Moffa EB, da Silva MA et al. In vitro Effects of Lemongrass Extract on *Candida albicans* Biofilms, Human Cells Viability, and Denture Surface. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;28:6:71.
- 37- Doğan A, Bek B, Cevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent* 1995;23:313-8.
- 38- Heidrich D, Fortes CBB, Mallmann AT, Vargas CM, Arndt PB, Schroferneker ML. Rosemary, Castor Oils, and Propolis Extract: Activity Against *Candida Albicans* and Alterations on Properties of Dental Acrylic Resins. *J Prosthodont* 2019;28:e863-e868.
- 39- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997;13:258-69.
- 40- Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997;77:535-9.

- 41- Davi LR, Peracini A, Ribeiro Nde Q, Soares RB, da Silva CH, Paranhos Hde F. et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology* 2010;27:297-302.
- 42- Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Phillips' science of dental materials. 12th ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2013.
- 43- Wiltshire WA, Labuschagne PW. Staining of light-cured aesthetic resin restorative materials by different staining media: an in vitro study. *J Dent Assoc S Afr* 1990;45:561-5.
- 44- Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP. et al. Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater* 2010;26:e171-80.
- 45- Uchida H, Vaidyanathan J, Viswanadhan T, Vaidyanathan TK. Color stability of dental composites as a function of shade. *J Prosthet Dent* 1998;79:372-7.
- 46- Pinto Lde R, Acosta EJ, Távora FF, da Silva PM, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard relined acrylic resins. *Gerodontology* 2010;27:147-53.
- 47- Ma T, Johnson GH, Gordon GE. Effects of chemical disinfectants on the surface characteristics and color of denture resins. *J Prosthet Dent* 1997;77:197-204.
- 48- Sato S, Cavalcante MR, Orsi IA, Paranhos Hde F, Zaniquelli O. Assessment of flexural strength and color alteration of heat-polymerized acrylic resins after simulated use of denture cleansers. *Braz Dent J* 2005;16:124-8.
- 49- American Dental Association ADA. ANSI/ADA Standard No. 139 (ISO 20795-1). Denture Base Polymers: 2013.

TABELAS

Tabela 1 – Efeitos das diferentes soluções de imersão nas propriedades físicas e mecânicas das amostras.

Propriedades físicas e mecânicas	Grupos experimentais	Média (DP) [Mediana]		P
Rugosidade (Ra - μm)		Inicial	Final	
	C	0,045 (0,016) [0,041] ^{Aa}	0,032 (0,010) [0,034] ^{Ba}	0,011*
	S	0,042 (0,013) [0,040] ^{Aa}	0,032 (0,014) [0,029] ^{Aa}	
	NC	0,044 (0,009) [0,048] ^{Aa}	0,054 (0,015) [0,049] ^{Ab}	
	EC	0,041 (0,013) [0,041] ^{Aa}	0,050 (0,015) [0,046] ^{Abc}	
	P	0,036 (0,012) [0,031] ^{Aa}	0,035 (0,013) [0,040] ^{Aac}	
Cor (ΔE_{00})	C	2,10 (0,60) [2,13] ^a		0,715**
	S	1,91 (1,35) [1,56] ^a		
	NC	1,82 (1,15) [1,43] ^a		
	EC	2,17 (1,43) [1,85] ^a		
	P	2,07 (1,19) [1,56] ^a		
Microdureza Knoop (KHN, Kg/mm ²)	C	19,35 (0,31) [19,37] ^a		0,024**
	S	18,99 (0,58) [19,03] ^{ab}		
	NC	19,22 (0,20) [19,23] ^{ab}		
	EC	18,76 (0,33) [19,80] ^b		
	P	19,11 (0,45) [19,90] ^{ab}		
Resistencia flexural (MPa)	C	89,39 (3,83) [90,08] ^a		0,800*
	S	87,53 (5,34) [88,88] ^a		
	NC	88,04 (3,86) [87,5] ^a		
	EC	86,71 (3,65) [86,20] ^a		
	P	87,91 (6,65) [89,01] ^a		
Módulo de elasticidade (MPa)	C	2322,34 (149,16) [2270,93] ^a		0,924*
	S	2327,60 (87,35) [2313,57] ^a		
	NC	2335,75 (188,60) [2370,83] ^a		
	EC	2367,60 (177,54) [2405,88] ^a		
	P	2375,00 (178,60) [2425,34] ^a		
Força máxima (N)	C	113,65 (4,48) [111,91] ^a		0,100*
	S	112,09 (6,64) [110,89] ^a		
	NC	109,41 (5,65) [108,45] ^a		
	EC	107,38 (4,26) [106,23] ^a		
	P	112,45 (6,46) [111,95] ^a		
Alongamento (%)	C	7,19 (0,62) [6,96] ^a		0,142*
	S	6,77 (0,34) [6,83] ^a		
	NC	6,75 (0,34) [6,85] ^a		
	EC	6,79 (0,36) [6,75] ^a		
	P	6,85 (0,39) [6,95] ^a		

*ANOVA e teste de Tukey; **Teste de Kruskal Wallis e de Tukey; C = controle; S = saliva; NC = nano; EC = emulsão; P = Periogard. Letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença significativa entre medidas inicial e final. Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$; $n = 10$).

QUADROS

Quadro 1 – Soluções de imersão a que foram submetidas as amostras.

GRUPOS	SOLUÇÃO UTILIZADA	FABRICANTE
GI – Controle	Água Destilada	-
GII – Saliva artificial	Fosfato Potássio Dibásico, Fosfato Potássio Monobásico, Sorbitol 70%, Fluoreto de Sódio, Benzoato de Sódio, Cloreto de Potássio, Cloreto de Sódio, Cloreto de Magnésio Anidro, Cloreto de Cálcio Anidro, Água purificada, Espessante QSP.	Farmácia de Manipulação Apothicário
GIII – Nanoemulsão de Citronela – formulada com o óleo essencial da planta <i>Cymbopogon nardus</i>	Solução à 5 mg/mL do óleo essencial de citronela (Laudos anexo B e C) em Tween 20.	Manipulada no Laboratório de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara
GIV - Emulsão de Citronela – formulada com o óleo essencial da planta <i>Cymbopogon nardus</i>	Solução à 5 mg/mL do óleo essencial de citronela (Laudos anexos B e C) em goma xantana.	Manipulada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
GV - Colgate PerioGard (produto sem etanol)	Gluconato de clorexidina a 0,12% (digluconato formulado para uma base livre de clorexidina na concentração de 0,067%) e os seguintes componentes inativos: água, glicerina, propilenoglicol, sorbitol, PEG-40 óleo de rícino hidrogenado, composição aromática com sabor predominante de menta, cloreto de cetilpiridínio, ácido cítrico, CI 42090.	Colgate-Palmolive Company

ANEXO A – NORMA DO PERIÓDICO AO QUAIS SERÃO SUBMETIDOS OS CAPÍTULOS 1 e 2

Periódico de escolha para submissão: Journal of Prosthetic Dentistry (JPD)

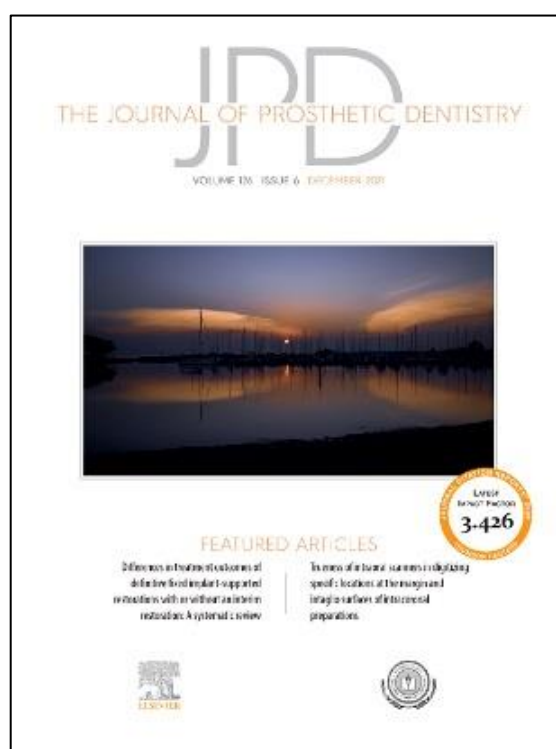
Qualis Capes: A1

Fator de Impacto: 3.426

Normas para submissão estão disponíveis no link:

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-prosthetic-dentistry/0022-3913/guide-for-authors>

Editor: Stephen F. Rosenstiel, Columbus, Ohio.



ANEXO B - LAUDO DA CITRONELA

E-33717
S/FC

Fagron
personalizing medicine

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	OLEO ESSENCIAL CITRONEL WN	Data de Análise:	06-01-2020
Lote Interno:	19L21-B022-056711	Lote Fabricante:	04428/19
Data de Fabricação:	27-11-2019	Data de Validade:	27-11-2021
Origem:	Brasil	Procedência:	Brasil
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	056711

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	8000-29-1	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações:		Nome Científico:	Cymbopogon nardus

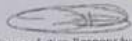
Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição	Líquido límpido.	Conforme		Fabricante
Cor	Amarelo claro a amarelo escuro.	Conforme		Fabricante
Impurezas	Isento.	Conforme		Fabricante
Odor	Característico.	Conforme		Fabricante
Densidade	0,875 - 0,895 (20°C)	0,881	g/mL	Fabricante
Índice de refração	1,455 - 1,475 (20°C)	1,467		Fabricante

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

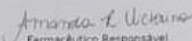
Conclusão:

Aprovado (X)

Reprovado ()



Farmacêutico Responsável
João Paulo Sartini Mendes
CRF-GO: Nº 7.355
Fagron Services Brasil



Farmacêutico Responsável
Amanda R. Victorino
CRF-SP Nº 50.836
Fagron Brasil
SAT: (11) 4785-5600

Fim do Documento

ANEXO C – FORMULAÇÕES DE CITRONELA



Aspecto visual da nanoemulsão com 5 mg/mL de óleo de citronela.



Aspecto visual da emulsão com 8 mg/mL de óleo de citronela.

Cálculo para a formulação da emulsão de citronela

$$880\text{mg} \cdot V_1 = 8\text{mg} \cdot 100\text{mL}$$

$$V_1 = 0,909 \text{ mL (909 microlitros de óleo em 100 mL de goma xantana)}$$

$$\text{Solução mãe de goma xantana} = 8 \text{ mg/mL de óleo de citronela}$$

ANEXO D – CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS DE RESINA ACRÍLICA

Foi utilizada uma matriz metálica (Fig. 1) vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada (n=10). Esta matriz foi posicionada sobre uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) e seu interior foi preenchido com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. E Com. Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil). Em seguida o conjunto lâmina de vidro e matriz metálica (Fig. 2) foi incluído em mufla (Vipi STG, VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, São Paulo, Brasil). Para isso, a superfície interna da base da mufla foi isolada com vaselina em pasta, sendo preenchida em seguida com gesso pedra tipo III (Asfer; São Caetano do Sul, SP, Brasil), seguindo a proporção de 100 g de pó para 30 mL de água, espatulado por 1 minuto e vertido sob vibração constante (Fig. 3A). Após a cristalização do gesso, uma segunda lâmina de vidro com as mesmas dimensões já citadas foi posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone de condensação Zetalabor (Zhermack, Rovigo, Italy; Fig. 3B). A contra-mufla foi posicionada e, sobre a superfície desta última lâmina de vidro foi vertido gesso pedra tipo III (Fig. 4A). Em seguida, a mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH, Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) sob pressão constante de 1000 Kgf por 2 minutos (Fig. 4B). Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a cera removida do interior de cada superfície interna da matriz. A superfície do vidro foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil). A RAAT (Fig. 5) foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante e, ao atingir a fase plástica, foi inserida no interior das superfícies internas da matriz incluída em mufla. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada à prensa hidráulica, com força de 1000 Kgf, durante 2 minutos, depois foi transferida para uma prensa manual e realizada a polimerização de bancada por 30 minutos. A resina foi polimerizada pelo método convencional, de acordo com o fabricante. Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta e as amostras foram removidas (Fig. 6) e submetidas ao polimento em uma politriz universal semiautomática (Arotec S.A. Ind Com, Cotia, São Paulo, Brasil), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 e 1200 - Buehler, Illinois, EUA), sendo posteriormente finalizadas com solução diamantada em disco de feltro (Fig. 7). Em seguida foi realizada a padronização da espessura das amostras utilizando a lixa de granulação 400 com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda; Fig. 8). Por fim, as amostras foram submetidas à limpeza em ultrassom (Ultracleaner 1400; UNIQUE) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem.



Figura 1 - Matriz Metálica



Figura 2 - Conjunto lâmina de vidro e matriz metálica

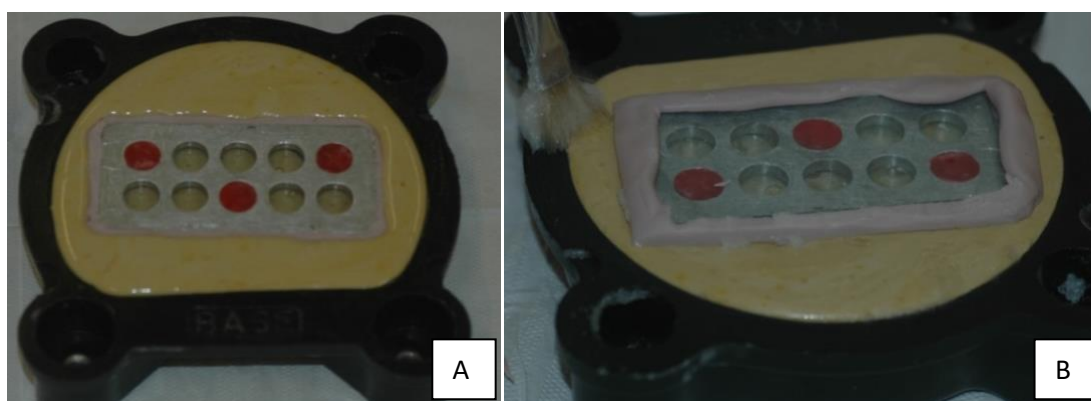


Figura 3 – (A) Inclusão em mufla do conjunto matriz/lâmina de vidro. (B) Segunda lâmina de vidro posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone de condensação Zetalabor

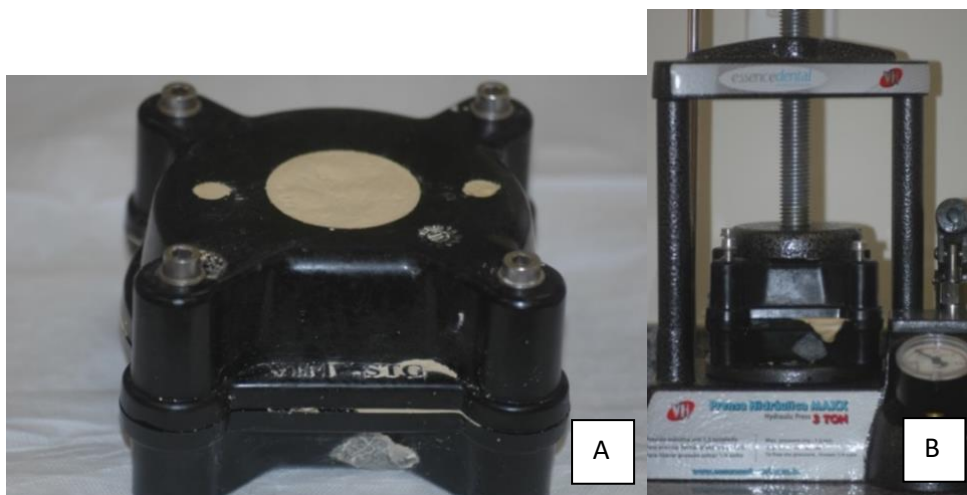


Figura 4 - (A) Mufla preenchida com gesso pedra tipo III. (B) Prensa hidráulica de bancada



Figura 5 - Resina acrílica ativada termicamente (RAAT)



Figura 6 - Amostras de RAAT



Figura 7 - Amostra de RAAT após acabamento e polimento



Figura 8 - Padronização da espessura das amostras

ANEXO E – REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

- 1- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997;13:258-69.
- 2- Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone. *Int J Biomater* 2009;2009:718017.
- 3- Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002;29:1115-9.
- 4- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*- associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:e139-43.
- 5- Maheronnaghsh M, Tolouei S, Dehghan P, Chadeganipour M, Yazdi M. Identification of *Candida* species in patients with oral lesion undergoing chemotherapy along with minimum inhibitory concentration to fluconazole. *Adv Biomed Res* 2016;5:132.
- 6- Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37:107-14.
- 7- Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:359-83.
- 8- Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:377-83.
- 9- Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011; 3:1–11.
- 10- Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010; 98:15–25.
- 11- Oliver RJ, Dhaliwal HS, Theaker ED, et al. Patterns of antifungal prescribing in general dental practice. *Br Dent J* 2004; 196:701-3.
- 12- Vale-Silva LA, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2015; 15:fov025.
- 13- Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of literature. *J Clin Periodontol* 1995;22:1-14.
- 14- Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont* 2000;13:136-40.
- 15- Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997;77:535-9.
- 16- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997;13:258-69.

- 17- Perez Davidi M, Beyth N, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI. Effect of liquid-polish coating on in vivo biofilm accumulation on provisional restorations: part 1. Quintessence Int 2007;38:591-6.
- 18- Atabek D, Sililelioglu H, Olmez A. The efficiency of a new polishing material: nanotechnology liquid polish. Oper Dent 2010;35:362-9.
- 19- Al-Rifaiy MQ. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. Saudi Dent J 2010;22:13-7.
- 20- da Silva WJ, Leal CM, Viu FC, Gonçalves LM, Barbosa CM, Del Bel Cury AA. Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida albicans* biofilms. J Investig Clin Dent 2015; 6:141-6.
- 21- Nikawa H, Nishimura H, Makihira S, Hamada T, Sadamori S, Samaranayake LP. Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses 2000; 43: 139–43.
- 22- Gocke R, Gerath F, von Schwanewede H. Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. Clin Oral Investig 2002; 6: 227–35.
- 23- Gonçalves LM, Madeira PLB, Diniz RS, Nonato RF, de Siqueira FSF, de Sousa EM. et al. Effect of *Terminalia catappa* Linn. on Biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata* and on Changes in Color and Roughness of Acrylic Resin. Evid Based Complement Alternat Med 2019; 7:7481341.
- 24- Miyake Y, Fujita Y, Minagi S, Suginaka H. Surface hydrophobicity and adherence of *Candida* to acrylic surfaces. Microbios 1986; 46:7-14.
- 25- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. Infect Immun. 1985; 47:11-4.
- 26- Hassel AJ, Wegener I, Rolko C, Nitschke I. Self-rating of satisfaction with dental appearance in an elderly German population. Int Dent J 2008;58:98-102.
- 27- Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Phillips' science of dental materials. 12th ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2013.
- 28- Berchier CE, Slot DE, Van der weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. J Clin Periodontol 2010;37:829–39.
- 29- da Costa LFNP, Amaral CDSF, Barbirato DDS, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. J Am Dent Assoc 2017;148:308-18.
- 30- Paranhos RM, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos Mda G. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. J Appl Oral Sci 2007;15:33-8.
- 31- Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC. et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. Gerodontology 2013;30:276-82.

- 32- Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology* 2013;30:32-9.
- 33- Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 2002;27:73-80.
- 34- Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav* 2001;74:85-99.
- 35- Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med* 2016;37:1594-600.
- 36- Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
- 37- Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *JARQ* 2003;37:249-252.
- 38- Siriporn P, Mayura S. The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Trop Biomed* 2012;29:138-50.
- 39- Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 2015;22:657-65.
- 40- Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 2009;4:29-34.
- 41- Guiotti AM, Goiato MC, Dos Santos DM, Vechiato-Filho AJ, Cunha BG, Paulini MB, et.al. Comparison of conventional and plant-extract disinfectant solutions on the hardness and color stability of a maxillofacial elastomer after artificial aging. *J Prosthet Dent* 2016;115:501-8.
- 42- Guiotti AM, Cunha BG, Paulini MB, Goiato MC, Dos Santos DM, Duque C, et.al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *J Prosthet Dent* 2016;116:136-43.