

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/04/2024.



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,

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, Sillelioglu 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.