



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

BRUNO GUANDALINI CUNHA

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

Araçatuba

2017

BRUNO GUANDALINI CUNHA

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

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

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Prof. Ass. Dra. Cristiane Duque

Araçatuba

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

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

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

Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti

Coorientadora: Profa. Cristiane Duque

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

Black D15
CDD 617.6

DADOS

CURRICULARES

BRUNO GUANDALINI CUNHA

Nascimento: 27/08/1991 – Tupã/SP

Filiação: Gilmar Cunha e Selma Guandalini Cunha

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

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

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

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

Associações – CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo

SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

APCD – Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas

DEDICATÓRIA

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

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

Te amo, vô Mário.

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EPÍGRAFE

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

Chico Xavier

*RESUMO GERAL EM
PORTUGUÊS*

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

RESUMO GERAL

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

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

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

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

*RESUMO GERAL EM
INGLÊS*

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

GENERAL ABSTRACT

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Referências em ANEXO A

Os capítulos 1 e 2 apresentados nesta dissertação seguem o guia de preparação de manuscritos do The Journal of Prosthetic Dentistry (JPD), disponíveis no ANEXO B.

Capítulo 1

Citotoxicidade e efeito do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de enxaguatórios bucais comerciais sobre biofilme de *S. aureus* e *C. albicans* em materiais protéticos.

RESUMO

Declaração do problema. Soluções enxaguatórias são empregadas como método coadjuvante para o controle do biofilme microbiano na superfície das próteses. Embora diversas dessas soluções estejam disponíveis comercialmente, informações sobre sua efetividade antimicrobiana e toxicidade sobre células humanas ainda são escassas ou inconsistentes. Assim, diversos extratos vegetais estão sendo incorporados em produtos para uso oral, buscando melhor potencial antimicrobiano e o mínimo de efeitos indesejados.

Objetivo. Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade e a eficácia de duas soluções à base do óleo de citronela (CN) sobre biofilmes monoespécie (*em formação* e *formado*) de *S. aureus* e *C. albicans* sobre resina acrílica ativada termicamente (RAAT) e em liga de níquel-cromo (LNC), representando os materiais empregados na prótese protocolo, em comparação com dois enxaguatórios comerciais sem etanol.

Materiais e Métodos. Inicialmente, foi determinada a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) da CN contra *S. aureus* (ATCC 14458) e *C. albicans* (ATCC 26790). Em seguida, duas soluções contendo CN nas concentrações de 5x e 10x a CBM/CFM foram preparadas por meio de microdiluição. Após a contaminação das superfícies de RAAT e LNC com esses microrganismos, as soluções enxaguatórias (CN 5x e 10x, Periogard sem etanol (CHX) e Listerine Zero (LT) foram avaliadas em relação ao seu efeito sobre o *biofilme em formação* (4 h de adesão) e sobre o *biofilme formado* (24 h). A simulação dos bochechos foi realizada em dois momentos diferentes, sendo a primeira simulação logo após o tempo de adesão de 4 h (*biofilme em formação*) e 24 h (*biofilme formado*), e a segunda simulação, 6 h após a primeira simulação, para cada microrganismo. O ensaio de citotoxicidade das soluções

foi realizado em células epiteliais HaCat, simulando o contato com os enxaguatórios por 1 min e quantificado pelo método de MTT.

Resultados. Independente da superfície, todas as soluções testadas, CN 5x, CN 10x, CHX e LT inibiram completamente a formação dos biofilmes de *S. aureus* e *C. albicans*, quando aplicados após o período de adesão inicial de 4 h. Para os *biofilmes formados*, todas as soluções mostraram atividade inibitória contra *S. aureus* e *C. albicans*, entretanto, CN (5x e 10x) levaram à maior redução microbiana, não diferindo estatisticamente entre si, independente da superfície da amostra. Em altas concentrações, todas as soluções testadas apresentaram efeito tóxico sobre células epiteliais. Entretanto, após diluição seriada, considerando as concentrações dos princípios ativos dos enxaguatórios comerciais, CN teve o menor efeito citotóxico.

Conclusão. As soluções de citronela testadas apresentaram menor efeito citotóxico e maior ação sobre biofilme de *S. aureus* e *C. albicans*, comparativamente às soluções comerciais.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Este estudo comprovou a eficácia do óleo de citronela sobre biofilme de importantes espécies microbianas que colonizam a superfície de próteses dentárias. No entanto, em altas concentrações, esse óleo apresentou toxicidade sobre células epiteliais, bem como as soluções comerciais. Assim, o óleo de citronela poderia ser uma alternativa de princípio ativo em soluções enxaguatórias bucais, entretanto, ajustes na sua concentração são necessários. Propostas de combinação do óleo de citronela em baixas concentrações com outros agentes com similar potência antimicrobiana poderiam ser estudadas.

INTRODUÇÃO

Com a descoberta dos implantes osseointegrados e a sua associação com reabilitações protéticas, a prótese total, antes utilizada como única opção para este tipo de reabilitação, passou a ser substituída pela prótese do tipo protocolo, que consiste em uma prótese total aparafusada em certa quantidade de implantes.

Por outro lado, é fato que os implantes e as próteses dentárias constituem-se como nichos para microrganismos, os quais, conseqüentemente levarão à colonização e formação de biofilmes, sendo os agentes etiológicos de doenças como a candidíase, mucosite, peri-implantite, e conseqüente perda de implantes.¹⁻⁵ Infecções sistêmicas também estão relacionadas com microrganismos da cavidade oral.⁶ Sendo assim, é de grande importância que o controle do biofilme tanto pelo paciente, quanto pelo profissional seja satisfatório, a fim de eliminar ou diminuir focos de biofilme microbiano, já que este tipo de prótese não pode ser retirado pelo paciente para promover a sua higienização.

Dentre os microrganismos presentes na microbiota bucal, fungos do gênero *Candida* são comensais e geralmente não causam doença. Porém, sob certas circunstâncias, eles podem agir como agentes infecciosos, causando o aparecimento de candidíase em pacientes imunodeprimidos.^{7,8} Também foi relatado que *C. albicans* é responsável por 70% dos casos de estomatites protéticas.⁹⁻¹⁰ Alguns estudos também detectaram a presença de *Candida* spp. em sítios de peri-implantites.¹¹⁻¹²

Outro grupo de microrganismos frequentemente isolados de superfícies protéticas é o dos *Staphylococcus*.¹³ O *Staphylococcus aureus* habita principalmente as superfícies das mucosas e tem sido considerado um dos mais versáteis e perigosos patógenos humanos, tendo habilidade para se aderir em superfícies de polímeros.^{13,14} Uma série de estudos clínicos identificaram níveis elevados de *S. aureus* dentro de bolsas peri-implantares supurativas e com sangramento, exibindo uma específica afinidade por superfícies de titânio.^{5,15,16}

Essa rotina de higiene necessária aos pacientes portadores deste tipo de prótese deve ser realizada por meio de técnicas de limpeza mecânica, e por meio de enxaguatórios bucais, como a solução de clorexidina a 0,12%, recomendada para áreas de difícil acesso e/ou em presença de inflamações, devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, minimizando a proliferação de microrganismos.^{17,18} Entretanto, o uso da clorexidina tem que ser indicado com cautela, visto que apresenta efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento de dentes artificiais e os materiais da base da prótese, alteração do paladar e citotoxicidade.¹⁹⁻²¹

Outra opção comercial largamente utilizada é o Listerine Zero (Johnson & Johnson), livre de álcool, sendo uma solução enxaguatória composta por óleos essenciais (eucaliptol, mentol, timol, salicato de metila). Estudos promovidos pelos próprios fabricantes do produto mostraram que estes antissépticos bucais, na sua maioria à base de álcool, são eficazes em inibir a formação de biofilme e prevenir a cárie dentária.^{22,23} Dessa forma, apesar dos produtos tradicionais (com etanol na composição) já terem sido muito pesquisados, os produtos sem etanol ainda merecem maior atenção. Dessa forma, pouca evidência científica existe acerca do potencial destes produtos em inibir microrganismos associados a doenças bucais, como a candidíase protética. Estudos sobre sua efetividade antimicrobiana/antibiofilme e também de citotoxicidade necessitam ser realizados.

Desse modo, observando a necessidade da busca de novos enxaguatórios bucais para auxiliar no controle de biofilme, visando à efetividade com o mínimo de efeitos indesejados, a fitoterapia passa a ser uma alternativa a ser estudada. A planta conhecida como citronela (*Cymbopogon nardus*) é utilizada para a obtenção de um óleo, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, geraniol e o citronelol, que são considerados antissépticos, por isso seu extenso uso em sabões e desinfetantes.²⁴⁻²⁶ Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa eficácia

antimicrobiana, como por exemplo, seu uso como agente desinfetante de próteses maxilofaciais.^{24,27-29} Nesse sentido, o óleo de citronela pode ser considerado um potencial fitoterápico de ação antibacteriana e antifúngica, abrindo novas perspectivas de soluções para controle do biofilme bucal. A literatura não traz resultados do óleo de citronela como enxaguatório bucal.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade e a eficácia de duas soluções à base do óleo de citronela (CN) sobre biofilmes monoespécie (*em formação e formado*) de *S. aureus* e *C. albicans* sobre amostras de resina acrílica ativada termicamente e liga de níquel-cromo, representando os materiais empregados na prótese protocolo, em comparação com dois enxaguatórios comerciais sem etanol. A primeira hipótese testada foi a de que as soluções à base de citronela teriam eficácia semelhante às soluções enxaguatórias comerciais sobre os biofilmes de ambos os microrganismos. E a segunda hipótese foi a de que o efeito citotóxico de citronela seria menor ou igual em relação aos produtos comerciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas microbianas e condições de crescimento

As espécies microbianas avaliadas nesse estudo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Candida albicans* (ATCC 26790), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Para a obtenção das culturas microbianas, essas espécies foram reativadas a partir de amostras padrão congeladas em freezer -80 °C e cultivadas em *Mannitol Salt Agar* (MAS; Difco Laboratories) para *S. aureus* e *Sabouraud Dextrose Agar* (DAS; Difco Laboratories) para *C. albicans*, incubados a 37 °C por 24 h em aerobiose (Binder GmbH). A seguir, foram repicadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco Laboratories) suplementado com 1% de glicose (Sigma-Aldrich) para *S. aureus* e *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB; Difco

Laboratories) para *C. albicans*, incubadas a 37 °C por 18-24 h antes do dia do experimento, em aerobiose e sob agitação (agitadora orbital - TE-420; Tecnal), com controle de luminosidade e temperatura.³⁰ Para a padronização dos ensaios microbiológicos, a partir de culturas overnight, novas culturas foram padronizadas até a densidade óptica (DO) de 0,5 para *S. aureus* (aproximadamente $1-5 \times 10^8$ UFC/mL) e 0,3 para *C. albicans* (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL), mensurada em espectrofotômetro (Eon Microplate; BioTek) considerando a absorbância de 550 nm.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida (CBM/CFM) mínima

Com o objetivo de determinar as concentrações do óleo de citronela (CN) a serem utilizadas na formulação dos enxaguatórios testes, foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) pelo método de microdiluição usando microplacas de 96 poços estéreis (Kasvi) baseado nos critérios do protocolo *National Committee for Clinical Laboratory* (NCCL) para bactérias e fungos.^{31,32}

O óleo de CN (concentração de citronelal $\geq 70\%$, ANEXO C) foi então filtrado em um filtro 0,22 μm (Kasvi) para assegurar sua esterilidade e desse modo foi feita a diluição seriada em dois tipos de veículos (um solvente hidrossolúvel e um lipossolúvel), a fim de se testar qual deles promoveria maior efetividade antimicrobiana do óleo: água deionizada estéril ou triglicérides de ácido cáprico-caprílico (TACC, ANEXO D), um veículo oleoso utilizado largamente na indústria cosmética, alimentícia, e farmacêutica por ser biodegradável e de origem natural, além de ser biocompatível.³³ Após atingir a densidade óptica padrão - OD (descrita no item “Cepas microbianas e condições de crescimento”), 4 mL da cultura microbiana foi centrifugada (K3 series; Centurion Scientific) durante 10 min, a 4000 rpm e 25

°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com solução salina estéril, e posteriormente foi colocado em centrifugação seguindo os parâmetros anteriores. Após a decantação do *pellet*, o sobrenadante de solução salina foi descartado, e então foi adicionado 4 mL do meio RPMI-1640 (2x concentrado; Sigma-Aldrich) para *C. albicans* e 4 mL do caldo *Mueller-Hinton* (MH-2x concentrado; Difco Laboratories) para *S. aureus*. A partir desta solução foi realizada a diluição de 1000x para *S. aureus* utilizando caldo MH e 10x para *C. albicans* utilizando caldo RPMI-1640.

As concentrações finais diluídas das suspensões microbianas pipetadas foram de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml para *S. aureus* e $1-5 \times 10^3$ UFC/ml para *C. albicans*. O digluconato de clorexidina à 2%, diluído seriadamente foi utilizado como controle positivo; e como controle negativo, culturas sem agentes antimicrobianos. Deste modo, foi possível obter concentrações que variavam de 35% até $2,08 \times 10^{-6}$ % do óleo de citronela. As suspensões microbianas foram inoculadas em cada poço contendo o fitoterápico previamente diluído. As microplacas foram incubadas a 37 °C, em aerobiose durante 24 h para os dois microrganismos. Após esse período, aplicou-se 15 µL de resazurina a 0,01% (R7017; Sigma-Aldrich) em cada poço e incubou-se durante 4 h para determinar a viabilidade celular.³⁴ Após a incubação, o último poço azul (CIM) e pelo menos dois poços anteriores foram diluídos em série e plaqueados em *Mueller-Hinton agar* (MHA) (Difco Laboratories) para *S. aureus*, e SDA para *C. albicans* durante 20-24 h, nas mesmas condições. Por fim, as células viáveis foram contadas em lupa esterioscópica (CP602; Phoenix Luferco) e determinou-se o número de colônias (UFC/mL). A CBM/CFM foi considerada quando os agentes antimicrobianos eliminaram 99.9% das cepas microbianas testadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Enxaguatórios comerciais utilizados e formulação dos fitoterápicos para teste de eficácia antimicrobiana.

Para o ensaio de biofilme, foram selecionados dois enxaguatórios comerciais sem etanol e duas concentrações do enxaguatório à base do óleo de CN (Quadro 1), sendo os comerciais: o Periogard sem etanol (Colgate) e o Listerine Zero (Johnson & Johnson). E para os fitoterápicos foram formuladas duas concentrações diferentes, multiplicando-se 5x a CBM/CFM e 10x a CBM/CFM do óleo de CN. Para a manipulação do enxaguatório fitoterápico foi realizado o cálculo percentual em relação ao óleo de citronela através da fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, uma vez que o mesmo possuía $\geq 70\%$ de citronelal (Anexo C). O óleo foi filtrado por um filtro 0,22 μm (Kasvi) para a sua esterilidade, em seguida a quantidade calculada foi diluída em água deionizada estéril, pois o mesmo destacou-se como o veículo mais eficaz na promoção do efeito antimicrobiano do óleo de CN, necessitando de diluições menos concentradas para atingir o CBM/CFM em comparação com o TACC. Para controle negativo foi utilizado soro fisiológico estéril (Samtec).

Confecção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)³⁵

Foram confeccionadas 70 amostras de RAAT (VipiCril Plus; VIPI Produtos Odontológicos), utilizando-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 ($n=10$). 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 min em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem (ANEXO E).

Confecção das amostras em liga de níquel-cromo (LNC)³⁵

Foram fundidas 70 amostras de LNC (Ligga N; VIPI Produtos Odontológicos), utilizando-se a técnica da cera perdida. Inicialmente foram confeccionados os padrões de cera (Rainbow branca opaca RW-02; Ceras Rainbow Ltda) utilizando uma matriz em acrílico produzida sob medida, com furos de 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Em seguida os padrões de cera foram unidos aos *sprues* (Babinete) e este conjunto foi fixado ao anel de fundição de silicone. O revestimento fosfatado (Calibra Express; VIPI Produtos Odontológicos) foi manipulado e vertido sobre o anel. Após a presa do bloco de revestimento, o mesmo foi colocado em forno até a queima completa da cera. Em paralelo foi realizada a fundição da LNC com o auxílio de um maçarico (EDG), e a liga fundida foi injetada no interior do bloco de revestimento através de uma centrífuga (C1; EDG). Após a desinclusão e retirada dos padrões fundidos, os mesmos passaram por um jateamento (Profissional Jet; EDG) com partículas de óxido de alumínio de 50 µm de diâmetro (Bioart), seguido do recorte das amostras com o auxílio de um disco de carborundum. A lateral das amostras foi regularizada e foi dado o brilho com pedra trimmer e borracha, respectivamente. Uma das superfícies planas das amostras foi submetida ao polimento em uma politriz universal semi-automática (Arotec S.A. Ind Com), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 - Buehler). Em seguida foi realizada a planificação e padronização da espessura das amostras na faixa de 2,8 a 2,9 mm, utilizando uma lixa de granulação 150 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 do metal, e posteriormente foram deixadas ao ar livre para secagem.

Preparo das amostras para o ensaio de biofilme

Após a confecção das amostras de RAAT e LNC, as mesmas foram posicionadas no centro do fundo de poço de placas de 24 poços de acordo com a demanda, com o auxílio de fita dupla face, sendo que a parte polida ficou voltada para cima. Estas placas foram embaladas em papel grau cirúrgico e seladas em seladora térmica, e posteriormente enviadas para esterilização por óxido de etileno (Empresa Oximed).²⁹

Desenho do estudo e distribuição das amostras.

Como já citado, este estudo utilizou dois tipos de materiais para a formação do biofilme, em que as amostras de cada material (n=200) foram divididas em dois grupos de microrganismos: *S. aureus* (n=100) e *C. albicans* (n=100). Em seguida, para cada microrganismo, foram criados dois subgrupos, sendo o primeiro denominado *biofilme em formação* (n=50) e o segundo denominado *biofilme formado* (n=50, Fig. 1). Os experimentos foram realizados em duplicata, em ensaios independentes.

Ensaio de biofilme

Foi adicionado 1 mL de saliva artificial nos poços das placas de 24 poços para a formação da película salivar sobre as amostras de RAAT e LNC, com o intuito de facilitar a adesão microbiana.^{36,37} Após 2 h, a saliva foi removida e então adicionado 1 mL do meio de cultura utilizado para cada microrganismo (SDB ou BHI + 1% glicose) e inoculou-se 2 µL por poço da cultura de *C. albicans* ou *S. aureus* previamente padronizada [diluição de 10-1000x da cultura na DO. 0,3 e 0,5 respectivamente, conforme descrito no item “Determinação

da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)”. Em seguida, as placas foram posicionadas em agitadora orbital à 37 °C com luminosidade controlada, regulada em 120 rpm, com o objetivo de representar a dinâmica dos fluidos no meio bucal, independente do microrganismo selecionado.³⁷

Após 4 h de crescimento, o grupo *biofilme em formação* sofreu a simulação do primeiro bochecho, isto é, removeu-se cuidadosamente a cultura, adicionou-se 1 mL da solução enxaguatória selecionada [CN 5x e 10x, Periogard sem etanol (CHX) e Listerine Zero (LT)], a cada dois poços para melhor controle de tempo. As soluções foram mantidas em contato com as amostras por 1 min, sem agitação. Em seguida, as soluções foram removidas e o biofilme foi cuidadosamente lavado com solução salina a 0,9% estéril. Posteriormente, cada poço foi preenchido com 1 mL de meio de cultura estéril correspondente a cada microrganismo, e as amostras foram mantidas por mais 6 h em agitadora orbital com luminosidade e temperatura controlada a 37 °C. Decorrido este tempo, a simulação do segundo bochecho foi realizada, repetindo-se os mesmos cuidados do primeiro.

No grupo *biofilme formado*, para ambos os microrganismos, as placas foram incubadas inicialmente por 24 h, sendo neste momento realizada a primeira simulação de bochecho. Então, aguardou-se mais 6 h de incubação e em seguida, foi realizada a segunda simulação do bochecho, semelhante aos procedimentos realizados para os *biofilmes em formação* (Fig. 2).

Recuperação das células e quantificação das unidades formadoras de colônias

Para a recuperação de células bacterianas e fúngicas sobre a superfície das amostras, cada amostra foi retirada do poço (após a última simulação do bochecho), e com o auxílio de uma pinça estéril a mesma foi introduzida em um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril a 0,9% para que então estes tubos fossem levados à agitação em cuba

ultrassônica (Ultracleaner 1400; UNIQUE) por 10 min, seguido de agitação em vórtex (AP 56; Phoenix) durante 1 min.^{38,39} Em seguida, essa solução foi diluída seriadamente e inoculada em duplicata em placas de MSA para *S.aureus* e SDA para *C. albicans*. As placas foram então incubadas durante 20-24 h e realizada a contagem do número de UFC/mL, considerando de 30 a 300 UFC para cada quadrante.⁴⁰

Ensaio de citotoxicidade⁴¹

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.

As células epiteliais foram desprendidas após tratamento com tripsina-EDTA (TrypLETM Expressar; Life Technologies Inc.) a 37 °C por 5 min. Em seguida, 3x o volume de DMEM foi adicionado e a cultura celular foi coletada em tubos e centrifugadas a 500xg durante 5 min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio DMEM fresco, contadas em câmara de Newbaur e distribuídas em uma microplaca de 96 poços (200 µL/poço, 1x10⁵ células/mL), incubadas a 37 °C em 5% de CO₂. Após 24 h, removeu-se o meio de cultura e em seguida foi aplicada a quantidade de 200 µL de cada solução enxaguatória [CN a 10,9%, Periogard sem etanol (CHX) e Listerine Zero (LT)] seriadamente diluída em DMEM (de 50 a 1,56%). Utilizou-se inicialmente 10,9% para CN, pois esta foi a concentração mais eficiente contra biofilme de *S. aureus* e *C. albicans*. Os enxaguatórios permaneceram em contato com as células durante 1 min, a 37 °C em 5% de CO₂.

Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada através do ensaio de MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (Roche Diagnostics). Após a exposição aos enxaguatórios, os meios de cada poço foram aspirados e substituídos por 180 µL de DMEM adicionado de 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL de PBS estéril; Sigma Aldrich), para que então as células fossem incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ durante 4 h, protegidos da luz.⁴²

Posteriormente, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico a cada poço.⁴² A placa foi mantida sob agitação contínua em mesa agitadora durante 30 min, protegida da luz para dissolver os cristais de formazan formados. 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.⁴¹ Os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os dados da contagem microbiana em UFC/mL foram transformados em $\log_{10}+1$ (UFC/mL) devido à amplitude dos dados numéricos e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Para os ensaios de viabilidade celular, os dados foram submetidos aos testes de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($\alpha=.05$). Foi utilizado o Software SPSS (v17.0; IBM Corp) para a realização destas análises.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os valores de CIM e CBM/CFM (em %) para o óleo de CN contra *S. aureus* e *C. albicans*. Valores maiores de CIM e CBM/CFM foram obtidos para *S. aureus*.

Independente da superfície testada, todas as soluções deste estudo, CN 5x CBM/CFM, CN 10x CBM/CFM, CHX e LT impediram a formação de biofilme de *S. aureus* e de *C. albicans*, quando aplicados no início de sua formação (4 h de adesão). A média (desvio-padrão) do crescimento de *C. albicans* em superfície de resina e de metal (em log) foi de 4,77 (0,86) e 5,22 (0,33), respectivamente; e para *C. albicans* foi de 3,88 (0,43) e 3,74 (0,67), respectivamente.

A figura 3 mostra os resultados para *biofilme formado* de *S. aureus* e a figura 4 para *biofilme formado* de *C. albicans*. Todas as soluções diferiram dos controles, em resina ou em metal, apresentando atividade sobre biofilme de *S. aureus* e *C. albicans*.

Considerando as soluções fitoterápicas para *S. aureus* (Fig. 3), CN 5x CBM e CN 10x CBM tiveram os melhores resultados, não diferindo estatisticamente entre si, independente do material testado ($p < 0.05$). Estes resultados podem ser observados também em porcentagem de redução microbiana (Tabela 2). Comparativamente ao grupo controle, observou-se que a solução de CN 5x CBM reduziu 40,09% e 22,88%, o número de células de *S. aureus* na superfície das amostras de resina e metal, respectivamente. Para a solução de CN 10x CBM, houve uma redução de 37,91% e 36,79%, respectivamente para resina e metal. Foi observado também que ambas as concentrações de CN tiveram efeito superior às soluções de CHX e LT, independente da superfície ($p < 0.05$). CHX e LT não diferiram estatisticamente entre si, independente da superfície ($p > 0.05$), exceto para o grupo de resina acrílica.

Para o biofilme de *C. albicans*, as menores contagens microbianas foram observadas após a exposição à CN 10x CFM, porém não diferiu estatisticamente de CN 5x CFM, independente da superfície (Fig. 4). Na tabela 2, pode-se observar também a redução de 34,78% e 32,46%, o número de células de *C. albicans* na superfície das amostras de resina e metal, respectivamente, utilizando a solução de CN 5x CFM. Para a solução de CN 10x CFM houve uma redução de 47,13% e 30,02%, respectivamente para as amostras de resina e metal.

Tanto CHX quanto LT tiveram atividade antibiofilme inferiores comparativamente à CN, independente da concentração.

Para os ensaios de citotoxicidade, todas as soluções diluídas em 50 e 25% causaram toxicidade celular (Fig. 5). A partir de 12,5% somente a solução de CN permitiu crescimento celular em 40%. Quando as soluções foram diluídas em 6,25%, a taxa de viabilidade celular na presença de CN e LT foram maiores quando comparados com CHX. A partir da diluição 3,12%, todas as soluções permitiram mais de 70% de viabilidade celular. Quanto maior a diluição, maior a viabilidade celular na presença de todas as soluções. Considerando as concentrações dos princípios ativos de cada solução enxaguatória testada, como apresentada na tabela 3, CN teve o menor efeito citotóxico. Esse dado pode ser observado, por exemplo, na diluição 3,12%, em que a concentração de CN era 0,34%, muito maior que a da CHX (0,00375%) e dos componentes do LT (0,00187% para o timol, 0,0025% para o eucaliptol, 0,0187% para o salicilato de metila e 0,0012% para o mentol).

DISCUSSÃO

A primeira hipótese testada neste estudo foi recusada, visto que as soluções à base de citronela tiveram a maior eficácia sobre os biofilmes, comparativamente às soluções enxaguatórias comerciais. No que se refere aos *biofilmes em formação*, mesmo sem fricção mecânica ou agitação da solução, todos os enxaguatórios comerciais e fitoterápicos testados (nas duas concentrações 5x CBM/CFM e 10x CBM/CFM) foram efetivos, eliminando 100% do biofilme no início de sua formação, ou seja, com 4 h de adesão inicial. A efetividade de 100% de redução do *biofilme em formação* pode ser explicada devido ao pouco número de células aderidas, à fraca ligação dos microrganismos ao substrato e pouca proteção devido à insuficiente quantidade de matriz de glicopolissacarídeos para minimizar a atividade antimicrobiana dos enxaguatórios, fazendo com que os mesmos tenham maior contato com a

célula, rompendo a parede celular ou inibindo a ação das enzimas dos microrganismos, como relatado para LT.⁴³⁻⁴⁵ No caso da CHX, ocorre um dano na barreira de absorção da membrana, fazendo com que todo conteúdo citoplasmático sofra precipitação e coagulação.⁴⁶

Para os *biofilmes formados*, as soluções enxaguatórias reduziram de maneira estatisticamente significativa o número de UFC/mL. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por estudos clínicos e microbiológicos, os quais mostraram bons resultados no uso dos enxaguatórios para o controle de biofilme.¹⁸⁻²² Estes resultados também corroboram com alguns estudos no que diz respeito à redução estatisticamente significativa dos microrganismos quando as soluções de LT e CHX sem etanol foram utilizadas, embora esta redução microbiana tenha sido muito reduzida no presente estudo, principalmente contra *C. albicans*.^{17,18,22,23,47}

As soluções de LT e CHX sem etanol tiveram efeitos antibiofilme semelhantes, exceto para *S. aureus* em superfície de resina acrílica, em que o LT teve um menor efeito estatisticamente. Segundo alguns estudos, o Periogard sem etanol não possui boa efetividade em biofilmes com maior grau de organização, podendo ser explicado pelo fato destes biofilmes possuírem uma maior maturação, e conseqüentemente uma maior matriz extracelular, dificultando a penetração e ação deste tipo de enxaguatório.^{48,49}

Embora a literatura considere as soluções à base de clorexidina como padrão ouro em pesquisas, alguns estudos relataram efetividade inferior ou semelhante à forma convencional do LT, em pontos como efetividade antimicrobiana e antibiofilme, controle de cálculo e controle de gengivite.^{47,50,51} Um estudo avaliando também CIM e CBM/CFM dos 4 óleos essenciais contidos na formulação do Listerine (eucaliptol, mentol, timol, salicilato de metila) mostrou que estes princípios ativos deveriam estar em concentrações superiores às aquelas contidas no produto, para que o mesmo pudesse oferecer maior efetividade antimicrobiana.⁵²

A planta *Cymbopogon nardus* apresenta alguns princípios ativos, como os monoterpenos (citronelal, geraniol e citronelol), constituintes do óleo de citronela. Estes princípios possuem eficácia antifúngica claramente evidenciada.^{24,27,53} É relatado que o mecanismo de ação desses compostos ocorre pelo aumento da fluidez e permeabilidade da membrana dos microrganismos, induzindo distúrbios ou lise celular.⁵⁴ Um estudo realizado com *Trichophyton rubrum*, um fungo dermatófito, mostrou que o geraniol e citronelol induziram dano e perda da integridade da membrana citoplasmática destes fungos.²⁵ Ainda neste mesmo estudo, comprovou-se que estes constituintes alteram a biossíntese do ergosterol, um importante regulador da fluidez da membrana de fungos.^{25,55} Em outros estudos, foi evidenciada a eficácia do geraniol e citronelal em *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, através dos mesmos mecanismos já citados, justificando a alta efetividade da solução à base de CN neste estudo.^{26,56} Assim, os monoterpenos encontrados no óleo de CN avaliado neste estudo, possivelmente causaram alterações na membrana dos microrganismos, reduzindo sua proliferação.^{25,26,56} É relatado também a ação do citronelal e citronelol em bactérias como *S. aureus* e *E. coli*, nas quais houve alteração em suas membranas citoplasmáticas e paredes celulares, como consequência da permeabilidade relacionada às alterações das propriedades físico-químicas (hidrofobicidade e carga de superfície). Este estudo mostrou a ocorrência de 95 e 99% de dano à membrana citoplasmática de *S. aureus* após a exposição por 1 h ao citronelol e citronelal, respectivamente.⁵⁷

É de suma importância o conhecimento sobre a citotoxicidade de soluções que entram em contato com a mucosa oral, análise que complementa os resultados de efetividade antimicrobiana. Apesar das células da linhagem HaCat não serem específicas de mucosa oral, foi relatado em estudo de Kreling et al. (2016) que estas células tiveram um comportamento semelhante às da linhagem OBA-9, sendo estas, células específicas de epitélio gengival.⁴²

Sendo assim, estes resultados obtidos corroboram com alguns estudos no que diz respeito à citotoxicidade da CHX, mostrando reduzidas taxas de viabilidade de fibroblastos mesmo em baixas concentrações de clorexidina.²¹ No presente estudo, apenas a partir da diluição de 3,12% do princípio ativo de CHX (concentração de 0,00375% - 5 vezes mais diluída em relação à concentração inicial de 0,12%) foi possível obter um nível de viabilidade celular aceitável para as células epidérmicas HaCat.⁵⁸ A causa da citotoxicidade da clorexidina em células eucarióticas ainda é incerta, mas há relatos na literatura de que essa substância possa induzir o acúmulo de proteína no retículo endoplasmático, fazendo com que a célula entre em estresse, causando a morte por necrose ou apoptose.⁵⁹ Também a CHX pode inibir a atividade mitocondrial e síntese de proteína e DNA.⁶⁰ Um estudo confirmou que a clorexidina pode induzir a apoptose ou necrose a partir do distúrbio mitocondrial, aumento de Ca^{2+} intracelular e estresse oxidativo.⁶¹

Por outro lado, estudos não foram encontrados sobre a citotoxicidade do LT sem etanol fazendo com que este estudo seja pioneiro sobre o assunto. A concentração dos óleos essenciais para uma viabilidade aceitável (IC_{50}) foi de 0,0375% para o timol, 0,005% para o eucaliptol, 0,037% para o salicilato de metila e 0,0025% para o mentol em contato com as células HaCat utilizadas neste estudo, ou seja, a solução precisou ser diluída quatro vezes a partir da concentração inicial para que apresentasse resultados satisfatórios. Há evidências de que a concentração real do LT convencional apresente efeito citotóxico em células tronco de corpo adiposo bucal, mostrando diminuição da viabilidade celular.⁶²

Sendo assim, observou-se no presente estudo que embora os enxaguatórios comerciais estudados (CHX e LT) não contenham etanol na sua composição, eles se mostraram citotóxicos em sua concentração comercial. É sugerido que o uso de enxaguatórios livres de etanol seja indicado para pessoas com risco a desenvolverem algum tipo de lesão, contraindicando os enxaguatórios convencionais com etanol na composição.⁶³ Assim, ficou evidente

neste estudo que independente da presença ou não do etanol na composição, o uso destas soluções comerciais deverá ser indicado com cautela.

No que se refere à solução teste de citronela, as diluições iniciais (50% e 25%), ou seja, as concentrações de 5,45% e 2,75% foram tão citotóxicas quanto às primeiras concentrações testadas de CHX e LT. O resultado de viabilidade celular aceitável para citronela foi obtido também na diluição de 3,12%, ou seja, na concentração de 0,34% do princípio ativo, em que mais de 70% das células permaneceram viáveis.⁵⁸ Vale ressaltar que nesta mesma diluição (3,12%), as soluções de CHX e LT apresentaram concentrações de seus princípios ativos bem menores do que para a CN, o que mostra que os princípios ativos presentes na citronela são comparativamente menos tóxicos às células epiteliais. Ficou evidente que todas as soluções são citotóxicas nas concentrações em que são disponibilizadas comercialmente, muito embora, a presença da saliva no uso clínico destes enxaguatórios, possivelmente dilua e minimize este efeito citotóxico das mesmas. A outra hipótese deste estudo de que o efeito citotóxico da solução de citronela seria menor ou igual em relação aos produtos comerciais foi aceita.

Sendo assim, novos estudos deverão ser realizados, tendo como objetivos o isolamento dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana da citronela e a combinação destes princípios ativos com outras substâncias, a fim de manter ou melhorar a efetividade observada neste estudo e diminuir a citotoxicidade, possibilitando a utilização destes compostos com os menores efeitos adversos possíveis ao paciente.

CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que ambas as concentrações do enxaguatório à base de citronela tiveram os maiores efeitos antibiofilme, comparativamente às soluções comerciais sem etanol, contra *S. aureus* e *C. albicans*. Em altas concentrações, todas as soluções testadas

apresentaram efeito tóxico sobre células epiteliais. Entretanto, após diluição seriada, considerando as concentrações dos princípios ativos dos enxaguatórios comerciais, a citronela teve o menor efeito citotóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. J Dent Bristol 1998;26:299-304.
2. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. Clin Oral Impl Res 2000;11:146–155.
3. Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. Nurs Times 2003;99:52-3.
4. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;98:53-9.
5. Harris LG, Richards RG. *Staphylococci* and implant surfaces: a review. Injury 2006;37:S3-14.
6. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Br J Biomed Sci 2007;64:180-9.
7. 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.
8. 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.
9. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. Aust Dent J 1992;37:107-14.
10. 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.

11. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:339-45.
12. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence* 2015;6:183-7.
13. Veyries ML, Faurisson F, Joly-Guillou ML, Rouveix B. Control of *Staphylococcal* adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1093-6.
14. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012;33:5967-82.
15. Rams TE, Feik D, Slots J. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:29-32.
16. Zhuang LF, Watt RM, Mattheos N, Si MS, Lai HC, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:13-21.
17. Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2010;37:829–839.
18. da Costa LF, Amaral CD, Barbirato DD, Leão AT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2017;1-11.

19. Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
20. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et.al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2012;29:838-44.
21. 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.
22. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial. *Am J Dent* 2013;26:149-55.
23. Vlachojannis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine® Products: An Update on the Efficacy and Safety. *Phytother Res* 2016;30:367-73.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Kern ME, Blevins KS. *Medical Mycology: A Self-Instructional Text*. 2 ed. F.A. Davis Company, 1997.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. CLSI document M7-A5. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 5th ed., Wayne, PA, 2002^a.
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI document M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2002b.
33. Traul KA, Driedger A, Ingle DL, Nakhasi D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem Toxicol* 2000;38:79-98.
34. Hahnel S, Mühlbauer G, Hoffmann J, Ionescu A, Bürgers R, Rosentritt M, et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation and metabolic activity on dental materials. *Acta Odontol Scand* 2012;70:114-21.

35. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Phillips' science of dental materials. 12th ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2013.
36. 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.
37. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Biofouling 2011;27:711-9.
38. Nishikawa T, Yoshida A, Khanal A, Habu M, Yoshioka I, Toyoshima K, et al. A study of the efficacy of ultrasonic waves in removing biofilms. Gerodontology 2010;27:199-206.
39. de Foggi CC, Machado AL, Zamperini CA, Fernandes D, Wady AF, Vergani CE. Effect of surface roughness on the hydrophobicity of a denture-base acrylic resin and *Candida albicans* colonization. J Investig Clin Dent 2016;7:141-8.
40. Li W, Liu H, Xu Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. J Endod 2012;38:894-8.
41. 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.
42. 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.

43. Mandel ID. Antimicrobial mouthrinses: overview and update. J Am Dent Assoc 1994;125:2S-10S.
44. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv Dent Res 1997;11:24-32.
45. Brock T, Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock Biology of Microorganisms. 14th ed. London: Pearson; 2017.
46. da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses 2011;54:e712-7.
47. Eick S, Goltz S, Nietzsche S, Jentsch H, Pfister W. Efficacy of chlorhexidine digluconate-containing formulations and other mouthrinses against periodontopathogenic microorganisms. Quintessence Int 2011;42:687-700.
48. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. Eukaryot Cell 2011;10:1660-9.
49. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. J Endod 2011;37:657-61.
50. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. J Clin Periodontol 2004;31:878-84.

51. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol* 2011;82:174-94.
52. Vlachojannis C, Chrubasik-Hausmann S, Hellwig E, Al-Ahmad A. A Preliminary Investigation on the Antimicrobial Activity of Listerine[®], Its Components, and of Mixtures Thereof. *Phytother Res* 2015;29:1590-4.
53. 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;17:1-16.
54. 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.
55. Minnebruggen GV, François IEJA, Cammue BPA, Thevissen K, Vroome V, Borgers M, et al. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. *Open Microbiol J* 2010;4:22-32.
56. 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;198:459-72.
57. Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, Simões M. Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015:795435.

58. 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.
59. 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.
60. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;92:446-50.
61. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. Toxicol In Vitro 2008;22:308-17.
62. Park JB, Lee G, Yun BG, Kim CH, Ko Y. Comparative effects of chlorhexidine and essential oils containing mouth rinse on stem cells cultured on a titanium surface. Mol Med Rep 2014;9:1249-53.
63. Vlachojannis C, Winsauer H, Chrubasik S. Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. Phytother Res 2013;27:685-91.

As tabelas, imagens e quadros a seguir estão fora das normas da JPD em relação à ordem, para um melhor entendimento.

Quadro 1 – Enxaguatórios bucais que serão testados microbiologicamente e citotoxicamente.

GRUPOS	ENXAGUATÓRIOS BUCAIS	FABRICANTE
GI– Grupo Controle	Soro fisiológico estéril	Samtec
GII – Colgate Periogard (produto sem etanol)	Gluconato de clorhexidina a 0,12% (digluconato formulado para uma base livre de clorhexidina 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
GIII – Listerine Zero (produto sem etanol)	Água, thymol, menthol, metilsalicilato, sorbitol, eucaliptol, aroma (d-Limonene), lauril sulfato de sódio, Poloxamer 407, sucralose, ácido benzóico, sacarina sódica, benzoato de sódio, propileno glicol, CI 42053.	Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda
GIV – Solução teste formulada com o óleo planta <i>Cymbopogon narduz</i> (5x CBM/CFM do microrganismo)	Óleo do óleo de citronela	Farmácia de Manipulação Apothicário
GV – Solução teste formulada com o óleo da planta <i>Cymbopogon narduz</i> (10x CBM/CFM do microrganismo)	Óleo do óleo de citronela	Farmácia de Manipulação Apothicário

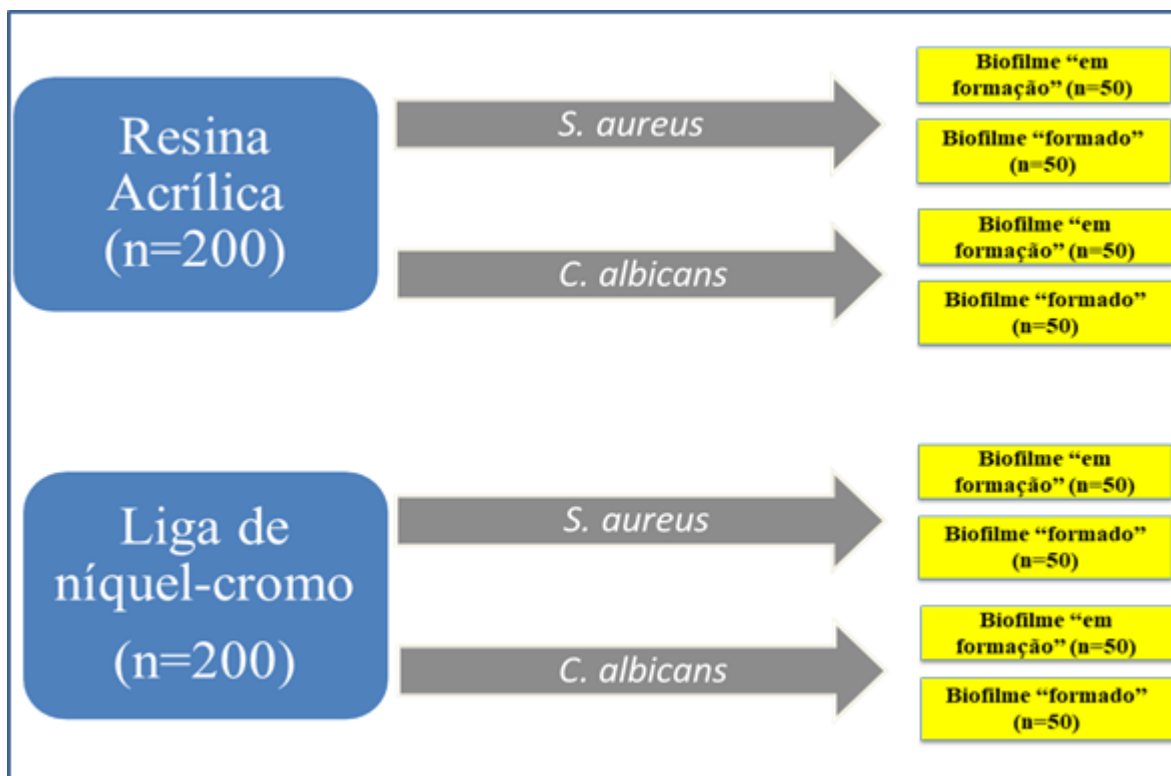


Fig. 1. Diagrama do delineamento do estudo.

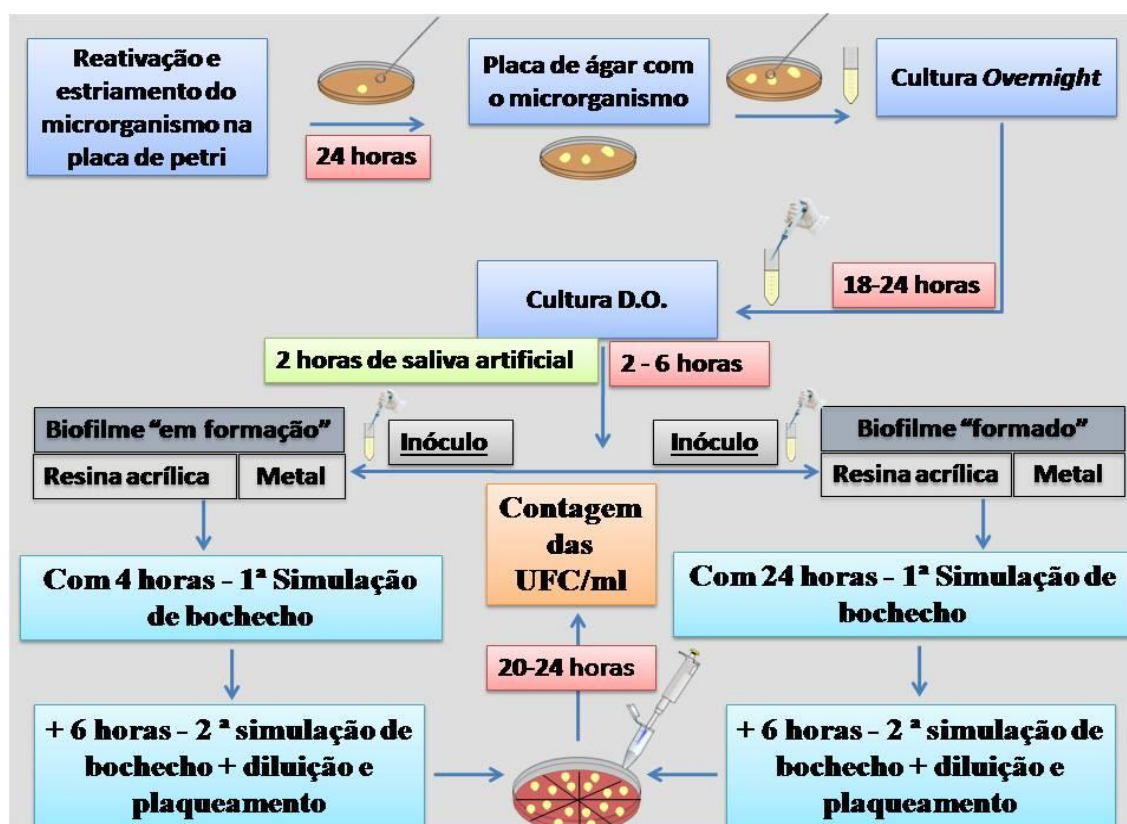


Fig. 2. Diagrama da metodologia dos ensaios de biofilme - da reativação até o plaqueamento.

Tabela 1. Valores de CIM e CBM/CFM obtidos para citronela (CN)

	CIM (%)	CBM/CFM (%)
<i>C. albicans</i>	1,09	1,09
<i>S. aureus</i>	2,18	2,18

Nota: CIM – Concentração inibitória mínima, CBM – Concentração Bactericida Mínima, CFM – Concentração fungicida mínima

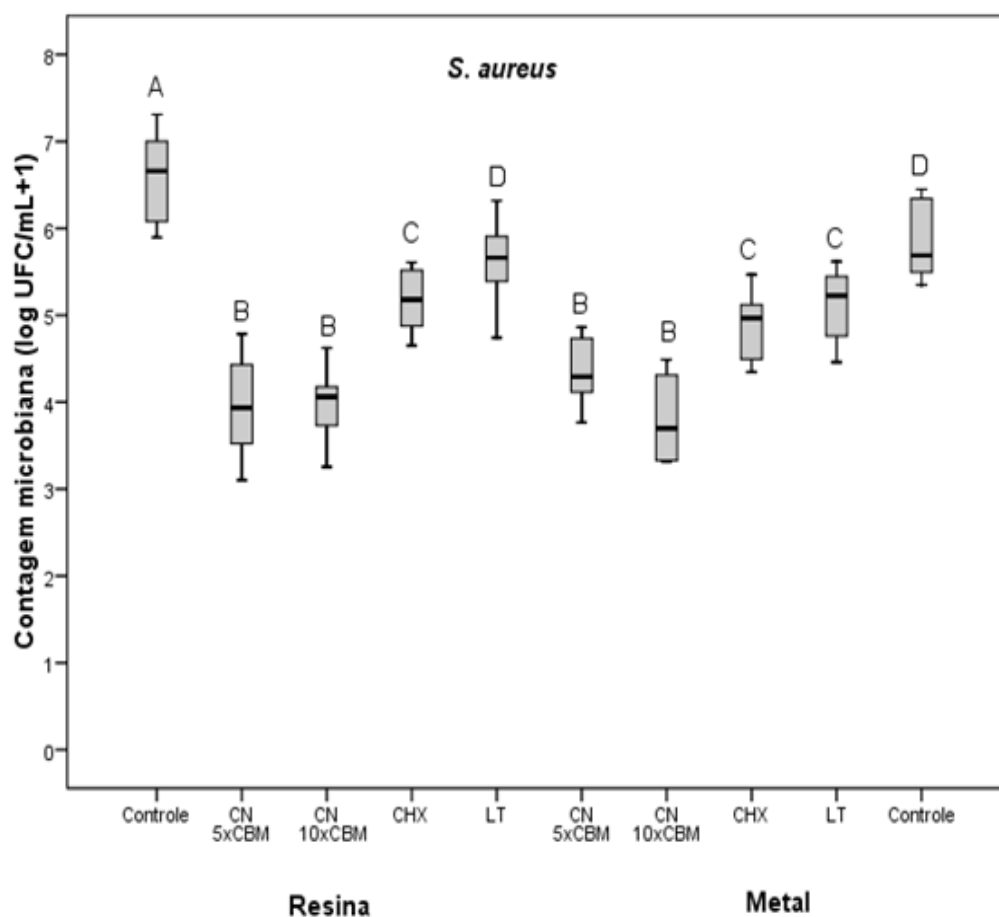


Fig. 3. Gráfico box-plots da atividade das soluções sobre *biofilme* formado de *S. aureus*.

Barras indicam valores mínimos e máximos. Caixas indicam quartis inferiores e superiores, respectivamente. A linha no meio representa a mediana.

^A Letras diferentes mostram diferença entre os grupos de soluções e superfícies testadas, resina ou metal, de acordo com os testes de Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$).

Nota: CN – Citronela, CBM – Concentração Bactericida Mínima, CHX – Periogard, LT – Listerine

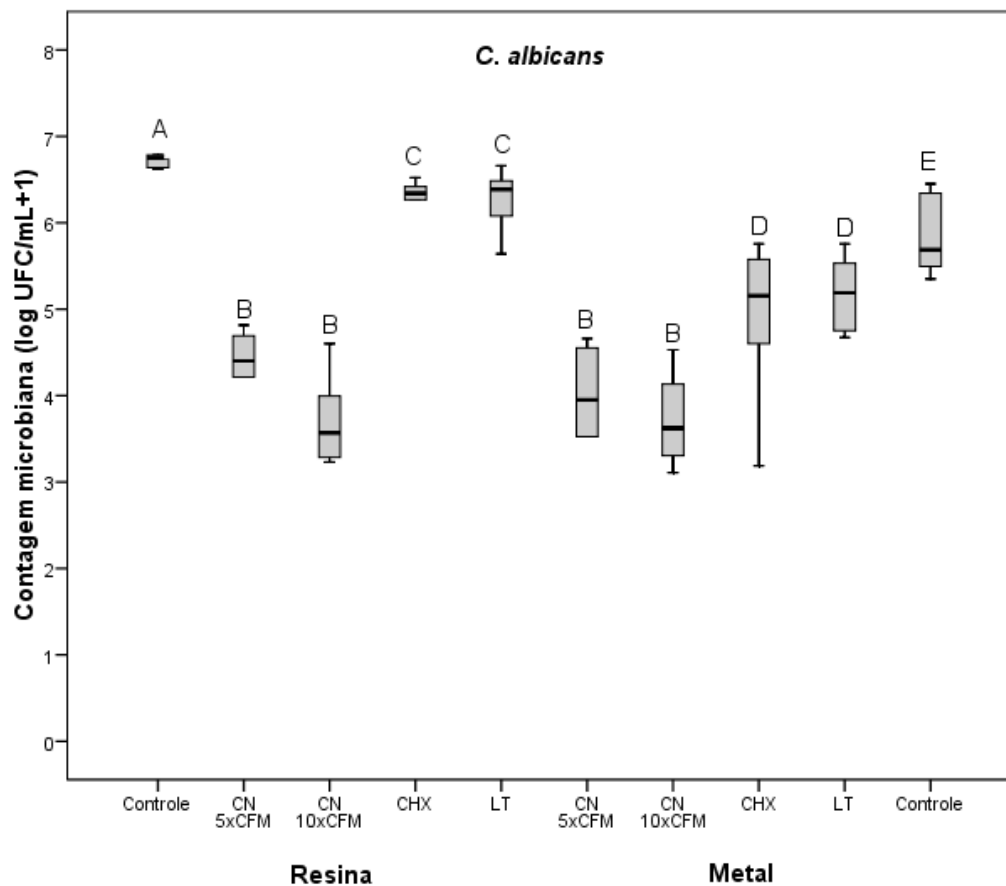


Fig. 4. Gráfico box-plots da atividade das soluções sobre *biofilme* formado de *C. albicans*. Barras indicam valores mínimos e máximos. Caixas indicam quartis inferiores e superiores, respectivamente. A linha no meio representa a mediana.

^A Letras diferentes mostram diferença entre os grupos de soluções e superfícies testadas, resina ou metal, de acordo com os testes de Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$).

Nota: CN – Citronela, CFM – Concentração Fungicida Mínima, CHX – Periogard, LT – Listerine

Tabela 2– Redução em porcentagem (%) do *biofilme formado* em relação ao controle para *S. aureus* e *C. albicans*, em ambos os materiais.

Soluções Enxaguatórias	Redução de microrganismos em %			
	<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	Resina	Metal	Resina	Metal
GII– CHX	21,14 C	15,07 C	6,07 C	11,88 D
GIII – LT	13,81 D	10,65 C	5,39 C	11,29 D
GIV - CN 5x CBM/CFM	40,09 B	22,88 B	34,78 B	32,46 B
GIV - CN 10x CBM/CFM	37,91 B	36,79 B	47,13 B	30,02 B

Nota: Letras diferentes mostram diferença entre os grupos de soluções para cada superfície testada, resina ou metal, de acordo com os testes de Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$).

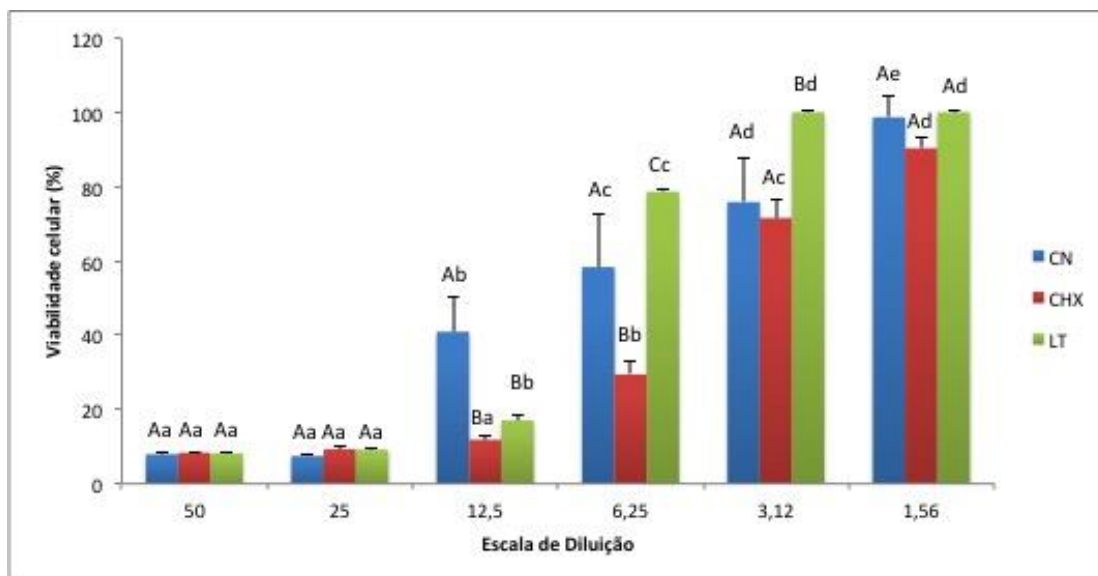


Fig. 5. Gráfico de barras da viabilidade das células epiteliais (HaCat) após exposição à diluições seriadas das soluções.

^A Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as soluções, considerando a mesma diluição (por ex. CN 50 x CHX 50), de acordo com os testes de ANOVA/Tukey.

^a letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as diluições, considerando a mesma solução (por ex. CN 50 x CN 25), de acordo com os testes de ANOVA/Tukey.

Tabela 3 - Viabilidade das células epiteliais (HaCat) após exposição à diluições seriadas das soluções. A tabela anexa mostra as concentrações dos constituintes das soluções testadas, de acordo com cada diluição realizada.

Diluição	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
	CN	CN	CN	CN	CN	CN
CN	5,45	2,75	1,36	0,68	0,34	0,17
	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX
CHX	0,06	0,03	0,015	0,0075	0,00375	0,001875
	Timol 0,3%	- Timol 0,15%	- Timol 0,075%	- Timol 0,0375%	- Timol 0,00187%	- Timol 0,000937%
	Eucalip: 0,046%	Eucalip: 0,023%	Eucalip: 0,011%	Eucalip: 0,005%	Eucalip: 0,0025%	Eucalip: 0,0012%
LT	Sal. Metila: 0,03%	Sal. Metila: 0,015%	Sal. Metila: 0,007%	Sal. Metila: 0,0037%	Sal. Metila: 0,00187%	Sal. Metila: 0,00093%
	Mentol: 0,021%	Mentol: 0,010%	Mentol: 0,005%	Mentol: 0,0025%	Mentol: 0,0012%	Mentol: 0,0006%

Nota: CN – Citronela, CHX – Periogard, LT – Listerine

Capítulo 2

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

RESUMO

Declaração do problema. A prótese do tipo protocolo, por ser uma prótese total fixa aos implantes, não permite a sua remoção, sendo necessárias técnicas intra-orais de limpeza mecânica e química, com enxaguatórios. Alguns produtos comerciais acarretam efeitos adversos aos materiais e ao próprio paciente, fazendo da fitoterapia uma alternativa a ser pesquisada.

Objetivo. Avaliar *in vitro*, o efeito de enxaguatórios bucais comerciais e de uma solução teste à base do extrato de citronela (CN – *Cymbopogon nardus*) a 10,9%, na alteração de rugosidade e cor de materiais utilizados na confecção de prótese tipo protocolo, sendo eles: duas marcas de dentes artificiais (DA - Trilux e Vivodent), uma resina acrílica ativada termicamente (RAAT) e liga de níquel-cromo (LNC).

Materiais e Métodos. Amostras dos três materiais foram distribuídas em 6 grupos (n=10), de acordo com a solução enxaguatória: GI - Saliva artificial; GII - Periogard sem etanol; GIII - Periogard com etanol; GIV - Listerine Zero; GV – Listerine Tartar Control; GVI - Solução teste à base de CN à 10,9%, sendo submetidas à imersão e agitação por 180 min, simulando bochechos diários por 6 meses. A alteração de superfície das amostras foi avaliada em rugosímetro, no qual um grupo sem imersão foi utilizado como controle (GC); e a alteração de cor, em espectrofotômetro.

Resultados. Todos os grupos de RAAT sofreram alteração de cor superior a 3,3, valor considerado clinicamente inaceitável. Para os DA, não houve diferença estatisticamente significante em relação aos grupos controles (Trilux $\Delta E=0,92$; Vivodent $\Delta E=0,94$). Na análise de superfície, a RAAT foi alterada somente no grupo GIV – Listerine Tartar Control

($R_a=0,078\ \mu\text{m}$), enquanto que não houve alteração estatisticamente significativa para os DA e LNC, em relação ao grupo controle.

Conclusão. A formulação teste à base de 10,9% de CN mostrou-se segura em seu uso como solução enxaguatória, no que se refere às propriedades físicas estudadas.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O extrato de citronela pode ser utilizado como solução enxaguatória bucal, na medida em que a rugosidade dos materiais foi preservada. No entanto, essa solução, assim como as comerciais testadas neste estudo, promoveu alteração de cor nos materiais. Portanto, modificações em suas composições são necessárias para prevenir complicações estéticas.

INTRODUÇÃO

É fato que as próteses dentárias favorecem a retenção de biofilme. Vários fatores físicos são importantes na colonização microbiana de superfícies, como a rugosidade, a hidrofobicidade e a composição química do material.^{1,2} A prótese tipo protocolo não permite que seja retirada da cavidade oral para higienização pelo paciente, assim deverá dar condições para que o mesmo realize sua correta higienização intra-oral e a mantenha livre do acúmulo de biofilme.

Duas classes de materiais são utilizadas na confecção deste tipo de prótese: as ligas metálicas e as resinas acrílicas, na forma de base acrílica da prótese e dentes artificiais. As ligas de níquel-cromo apresentam custo-benefício bom e propriedades mecânicas favoráveis.^{3,4} Esta barra metálica é revestida por uma base acrílica (polimetilmetacrilato, PMMA), normalmente uma resina acrílica ativada termicamente (RAAT) e pelos dentes artificiais. Estas superfícies de materiais deverão manter-se lisas, visto que a redução da

rugosidade de superfície resulta em um retardamento da formação e maturação do biofilme, além de minimizar alteração de cor.^{1,5-10}

A estabilidade da cor dos dentes artificiais e da base protética é um dos objetivos almejados, tornando-se imprescindível que ela se mantenha ao longo do tempo para se conseguir sucesso e longevidade da reabilitação oral.^{11,12} Dessa forma, os enxaguatórios bucais não deveriam acarretar alterações nesta propriedade física dos materiais relacionados com a prótese.

O sucesso do tratamento com próteses implanto-suportadas relaciona-se diretamente aos cuidados do dentista e do próprio paciente, e desta forma, entende-se que a higiene oral e/ou acompanhamento insuficientes levam à formação de biofilme em componentes protéticos, podendo ocasionar desde uma mucosite peri-implantar até uma peri-implantite, estomatite protética e infecções gastrointestinais e pulmonares em paciente imunodeficientes, pela deglutição e aspiração contínua de microrganismos do biofilme da prótese.¹³⁻¹⁷

A rotina de higiene deve ser realizada por meio de técnicas de limpeza mecânica, e por meio de enxaguatórios bucais, a fim de promover a desinfecção química da prótese.¹⁸⁻²¹ Dessa forma, soluções de bochecho devem ser utilizadas, dentre elas, a solução de clorexidina a 0,12%, recomendada para áreas de acesso difícil e/ou em presença de inflamações, devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática.^{21,22} Entretanto, seu uso tem que ser indicado com cautela, visto que existem efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento dos materiais da prótese, alteração do paladar, citotoxicidade, dentre outros.²³⁻²⁹ Outra opção comercialmente disponível para esta finalidade é o Listerine (Johnson & Johnson), que pode ser encontrado em duas formulações, sem etanol (Listerine Zero) e com etanol.³⁰⁻³² Estudos sobre sua influência na alteração de superfície e cor dos materiais necessitam ser realizados. No que diz respeito ao produto sem etanol,

existem poucos estudos comprovando sua eficácia antimicrobiana e nenhum estudo mostrando seus efeitos sobre as propriedades dos materiais.^{33,34}

Dessa forma, a fitoterapia 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 obtenção do extrato de citronela, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, geraniol e o citrionelol, que são antissépticos, daí seu extenso uso em sabões e desinfetantes domésticos.³⁵ Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa eficácia antimicrobiana.³⁵⁻³⁷ Nesse sentido, a citronela é considerada como uma planta de ação antibacteriana e antifúngica potencial, abrindo novas perspectivas de controle de infecção humana, como por exemplo, seu uso como agente desinfetante de próteses buco-maxilo-faciais.^{38,39} Com base nestas informações, percebe-se a necessidade da realização de estudos que investiguem a sua ação na alteração da superfície e cor de materiais utilizados na confecção de próteses do tipo protocolo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de uma formulação à base do extrato de citronela (*Cymbopogon nardus*) a 10,9% na alteração da cor e rugosidade de materiais que constituem a prótese do tipo protocolo (RAAT, duas marcas de dentes artificiais e uma liga de Ni-Cr), em comparação com quatro enxaguatórios bucais comerciais, com e sem etanol. A hipótese deste estudo foi a de que a solução enxaguatória à base de citronela promoveria danos similares aos demais enxaguatórios, no que se refere às propriedades físicas dos materiais testados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Confecção das amostras em resina acrílica ativada termicamente (RAAT)¹²

Foram confeccionadas 70 amostras de RAAT (VipiCril Plus; VIPI Produtos Odontológicos), utilizando-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). 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 min em água destilada, para remoção de possíveis debris na superfície da resina, e após isso foram deixadas ao ar livre para secagem (ANEXO E).

Confecção das amostras em liga de níquel-cromo (LNC)¹²

Foram fundidas 70 amostras de LNC (Ligga N; VIPI Produtos Odontológicos), utilizando-se a técnica da cera perdida. Inicialmente foram confeccionados os padrões de cera (Rainbow branca opaca RW-02; Ceras Rainbow Ltda) utilizando uma matriz em acrílico produzida sob medida, com furos de 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Em seguida os padrões de cera foram unidos aos *sprues* (Babinete) e este conjunto foi fixado ao anel de fundição de silicone. O revestimento fosfatado (Calibra Express; VIPI Produtos Odontológicos) foi manipulado e vertido sobre o anel. Após a presa do bloco de revestimento, o mesmo foi colocado em forno até a queima completa da cera. Em paralelo foi realizada a fundição da LNC com o auxílio de um maçarico (EDG), e a liga fundida foi injetada no interior do bloco de revestimento através de uma centrífuga (C1; EDG). Após a desinclusão e

retirada dos padrões fundidos, os mesmos passaram por um jateamento (Profissional Jet; EDG) com partículas de óxido de alumínio de 50 µm de diâmetro (Bioart), seguido do recorte das amostras com o auxílio de um disco de carborundum. A lateral das amostras foi regularizada e foi dado o brilho com pedra trimmer e borracha, respectivamente. Uma das superfícies planas das amostras foi submetida ao polimento em uma politriz universal semi-automática (Arotec S.A. Ind Com), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 - Buehler). Em seguida foi realizada a planificação e padronização da espessura das amostras na faixa de 2,8 a 2,9 mm, utilizando uma lixa de granulação 150 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 do metal, e posteriormente foram deixadas ao ar livre para secagem.

Dentes artificiais (DA)

Para avaliar a influência dos enxaguatórios bucais na alteração cromática e na alteração de rugosidade dos DA, foram utilizadas duas marcas comerciais: Trilux (VIPI Produtos Odontológicos - Modelo O32, cor 1D) e Ivoclar (Vivadent Ltda - Modelo SR Vivodent PE A13, cor 2A), totalizando setenta (70) incisivos centrais superiores, não importando nesta análise, o lote do material.

Formulação do enxaguatório à base do extrato de citronela

Por meio de resultados microbiológicos prévios (Concentração Bactericida Mínima e Fungicida Mínima – 5x CBM e 10x CFM, respectivamente), foi padronizada uma concentração de 10,9% do extrato de citronela, diluído em água deionizada para os testes físicos descritos a seguir, visto ter sido a concentração mais efetiva em eliminar uma espécie de bactéria (*S. aureus*) e um fungo comumente presente no ambiente oral (*C. albicans*).

Desinfecção das amostras de RAAT, LNC e DA

As amostras de RAAT, LNC e os DA foram divididos em 6 grupos, de acordo com a solução enxaguatória utilizada (Quadro 1), e um grupo adicional sem imersão para a análise de rugosidade (GC). As amostras foram imersas nas soluções enxaguatórias, sob agitação em mesa agitadora, em temperatura de 36 ± 1 °C, simulando bochechos diários de 1 min de duração, durante 6 meses. Para isso, 180 min de imersão corresponderam aos 6 meses de bochechos diários (Arruda CNF).⁴⁰ As soluções foram trocadas a cada 90 min.

Avaliação da estabilidade de cor

As amostras (RAAT e DA) foram submetidas aos ensaios de leitura de cor iniciais (baseline-B), utilizando-se a espectrofotometria de reflexão ultravioleta visível (Modelo UV-2450; Shimadzu). A estabilidade de cor da LNC não foi avaliada, visto não estar relacionada diretamente com a estética da prótese. Na sequência, as amostras de RAAT e os DA foram submetidos à ação dos enxaguatórios bucais, conforme protocolo citado anteriormente. Durante todo o período experimental, as amostras foram mantidas em saliva artificial, em estufa bacteriológica digital (CIENLAB Equipamentos Científicos LTDA) a 37 ± 1 °C. Após a simulação dos bochechos, novas leituras foram realizadas (T1), com as alterações de cor calculadas por meio do Sistema CIE L*a*b*, conforme estabelecido pela *Comission Internationale de l'Eclairage* – CIE (CIE).⁴¹ O sistema CIE L*a*b* calcula a variação de cor entre dois pontos por meio da fórmula: $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$. Com relação à estabilidade de cor no universo de cor do CIE L*a*b* avaliam-se os valores obtidos por (ΔE). Alguns estudos estabelecem parâmetros clínicos de análise deste ΔE , podendo-se obter três intervalos: $\Delta E < 1$ - alteração de não cor detectada pelo olho humano; $1 < \Delta E < 3,3$ – alteração

de cor considerada clinicamente aceitável; $\Delta E > 3,3$ - alteração de cor considerada clinicamente inaceitável.⁴²⁻⁴⁴

Avaliação da alteração de superfície dos materiais

A mensuração da rugosidade de superfície das amostras foi realizada em rugosímetro (Surftest SJ-400; Mitutoyo), que estabelece dados quantitativos de alteração de superfície do material antes e após os métodos utilizados para simular os bochechos. Para as amostras de RAAT e LNC, as mesmas 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. Para os DA, os mesmos foram encaixados em uma matriz de silicone de consistência densa (Zetalabor; Zhermack) e as leituras foram realizadas no sentido transversal ao longo eixo dos DA. A extensão de cada leitura foi de 1,25 mm, com cut-off de 0,25 mm. A velocidade da leitura foi de 0,1 mm/seg. Os valores de rugosidade iniciais foram obtidos pela média aritmética e dados em micrometros. Esta análise foi realizada em 10 amostras de cada grupo (baseline), escolhidas aleatoriamente. Novas leituras foram realizadas após a simulação dos bochechos por 6 meses.

Forma de análise dos dados

Os dados obtidos no teste de alteração de cor (ΔE) e rugosidade foram submetidos ao teste de aderência à curva normal a fim de determinar se os mesmos provinham ou não de uma distribuição normal. Como os dados apresentaram uma distribuição normal, a análise de variância (ANOVA) um fator foi aplicada. Como foi indicada diferença estatística significativa entre os fatores analisados, foi aplicado o teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$), a fim de comparar os valores médios de alteração de cor e rugosidade das amostras estudadas (Software SPSS v19.0; IBM Corp.).

RESULTADOS

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão apresentadas as análises de variância (ANOVA) e na tabela 4, os valores médios da alteração de cor (ΔE) das amostras de RAAT e DA, para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

A tabela 1 da ANOVA denota que houve diferença estatística significativa para o fator solução ($p= 0.002$), para as amostras de RAAT. Foi possível perceber na Tabela 4 que todos os grupos sofreram alteração de cor superior a 3,3, valor considerado clinicamente inaceitável. Quando os grupos foram comparados entre si, observou-se que apenas o GI (saliva artificial) foi diferente estatisticamente das demais soluções ($p < 0.05$).

A tabela 2 da ANOVA denota que não houve diferença estatística significativa para o fator solução ($p= 0,967$), para as amostras de DA da marca Trilux. Foi possível perceber na tabela 4 que apenas os grupos GII (Periogard sem etanol) e GIII (Periogard com etanol) sofreram alteração de cor superior a 1, valor considerado visível, porém clinicamente aceitável. Os demais grupos também sofreram alteração de cor, porém os valores foram inferiores a 1, não sendo detectados pelo olho humano. Quando os grupos foram comparados entre si, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0.05$).

A tabela 3 da ANOVA denota que não houve diferença estatística significativa para o fator solução ($p = 0,965$), para os DA da marca Vivodent. Foi possível perceber na tabela 4 que apenas os grupos GII (Periogard sem etanol), GIII (Periogard com etanol) e GIV (Listerine Zero) sofreram alteração de cor superior a 1, valor considerado visível, porém clinicamente aceitável. Os demais grupos também sofreram alteração de cor, porém os valores foram inferiores a 1, não sendo detectados pelo olho humano. Quando os grupos foram

comparados entre si, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0.05$).

Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 estão apresentadas as análises de variância (ANOVA) e na tabela 9, os valores médios da alteração da rugosidade das amostras de RAAT, DA e LNC, para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

A tabela 5 da ANOVA denota que houve diferença estatística significativa para o fator solução ($p < 0.001$), para as amostras de RAAT. Na tabela 9, quando os grupos foram comparados entre si, observou-se que apenas o GV (Listerine Tartar Control) foi diferente estatisticamente das demais soluções ($p < 0.05$). Nos demais grupos, os valores de rugosidade foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (Sem imersão; $p < 0.05$).

Conforme a tabela 6 da ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa para o fator solução ($p = 0,075$), para as amostras de DA da marca Trilux. Assim, pode-se observar na tabela 9, que independentemente da solução utilizada, não houve um aumento estatisticamente significativo no valor de rugosidade para todos os grupos, após 6 meses de simulação dos bochechos.

A tabela 7 da ANOVA denota que houve diferença estatisticamente significativa para o fator solução ($p = 0,002$), para as amostras de DA da marca Vivodent. Assim, pode-se observar na tabela 9, que apenas o grupo GV (Listerine Tartar Control) promoveu uma redução estatisticamente significativa no valor de rugosidade para os DA da marca Vivodent, após 6 meses de simulação dos bochechos, quando comparado aos grupos GI (saliva artificial) e GII (Periogard sem etanol). Os demais grupos se mostraram estatisticamente semelhantes entre si.

A tabela 8 da ANOVA denota que não houve diferença estatisticamente significativa para o fator solução ($p = 0,199$), para as amostras de LNC. Assim, pode-se observar na tabela 9, que independentemente da solução utilizada, não houve alteração estatisticamente

significativa no valor de rugosidade para todos os grupos das amostras de LNC, após 6 meses de simulação dos bochechos.

DISCUSSÃO

O controle de formação de biofilme é primordial para a preservação da osseointegração dos implantes e para a manutenção da saúde da cavidade oral dos portadores de prótese do tipo protocolo. Este controle, realizado por meio de técnicas de limpeza mecânica, e por meio de enxaguatórios bucais, não deveria acarretar alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais. Embora a quantidade de estudos seja vasta em analisar os efeitos de soluções químicas sobre as propriedades dos materiais, agindo como desinfetantes extra-orais, este estudo foi pioneiro em analisar o efeito de soluções enxaguatórias na forma de bochechos (Davi LR, Paranhos HFO).^{45,46} Com base nisto, a hipótese testada neste estudo, no que se refere à propriedade de cor foi aceita, visto que a solução enxaguatória à base de citronela promoveu alteração de cor apenas nas amostras de RAAT, de forma semelhante às demais soluções comerciais. Entretanto, não promoveu alteração de rugosidade em nenhum dos materiais testados.

No que se refere ao material de confecção da base protética (RAAT), todas as soluções utilizadas promoveram alteração de cor acima do considerado clinicamente aceitável ($\Delta E > 3,3$).⁴²⁻⁴⁴ A estabilidade de cor dos DA e da base protética é imprescindível para que a estética se mantenha ao longo do tempo e se consiga sucesso e longevidade da reabilitação oral.¹² 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, etc).⁴⁷ Os fatores intrínsecos se relacionam às alterações internas do material, em sua matriz resinosa, ou ainda à oxidação de monômeros residuais e aminas terciárias.⁴⁸⁻⁵¹ Existe correlação entre a alteração de cor e o grau de conversão de resinas acrílicas e resinas compostas incompletamente polimerizadas, apresentando propriedades

mecânicas reduzidas, com maior suscetibilidade ao manchamento.^{52,53} Dessa forma, estudos mostram que quanto maior o grau de conversão dos monômeros em polímeros (maior eficiência da polimerização), melhor a estabilidade química e consequentemente, melhores serão as propriedades mecânicas e estéticas do material.

As soluções enxaguatórias promoveram alteração de cor clinicamente inaceitável nas amostras de RAAT utilizadas neste estudo. Este fato pode ser explicado pelo menor grau de conversão dos monômeros obtido pela técnica convencional de polimerização preconizada pelo fabricante e também pela presença de porosidades na superfície do material.⁵⁴ A volatilização dos metacrilatos submetidos a elevadas temperaturas, durante o processo de polimerização predispõe à formação de porosidades e/ou irregularidades na superfície das resinas.^{54,55} Além disso, o PMMA em meio aquoso é susceptível à sorção de substâncias no seu interior (absorção) ou à sua deposição superficial (adsorção), alterando suas propriedades, como a cor.^{12,56,57} A absorção ou adsorção de líquidos pelos polímeros depende de sua composição química, características superficiais, rugosidade, polaridade, quantidade de monômero residual e porosidades, devido ao superaquecimento ou pressão insuficiente durante a polimerização.

Entretanto, para os DA, independente da marca comercial, não houve alteração de cor acima dos valores críticos considerados por estudos, ou seja, acima de 3,3.⁴²⁻⁴⁴ Os maiores valores de ΔE foram os observados para os grupos submetidos às soluções de clorexidina a 0,12% (GII e GIII), tanto para os DA da marca Trilux quanto para os DA da marca Vivodent, embora estes valores não tenham sido considerados estatisticamente diferentes dos demais grupos. Estes dados corroboram com alguns estudos, que afirmam que o uso da clorexidina promove efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento de DA e os materiais da base da prótese.²⁶⁻²⁸

Os DA da marca Trilux e Vivodent são compostos por tripla prensagem. A aplicação de diferentes camadas melhora a estética e permite uma maior estabilidade de cor, devido à melhor polimerização. Estes DA são compostos por monômeros resinosos multi-funcionais (com mais sítios de ligação), aumentando as cadeias de polimerização. Há também a incorporação de carga inorgânica (cerâmicas), e a presença de cargas inorgânicas, misturadas à matriz resinosa, tem efeito positivo nas características físicas e mecânicas do material.⁵⁸ Quanto menor o conteúdo orgânico, melhor serão as propriedades físicas e mecânicas do material.¹² As formas de polimerização destes DA sob condições específicas, embora o fabricante não informe (como calor, pressão, vácuo e/ou ambientes livres de oxigênio), também influenciam em uma completa polimerização, ou conversão dos monômeros em polímeros, melhorando suas propriedades ao longo do tempo.

A solução teste formulada à base do extrato de citronela, mostrou-se segura em seu uso, no que se refere a esta propriedade, visto que se comportou estatisticamente semelhante às demais soluções comerciais testadas, para as amostras de RAAT. Para os DA, não foi possível estabelecer diferença estatisticamente significativa entre as soluções. A alteração de cor promovida pela solução de citronela não foi capaz de ser detectada pelo olho humano.

Os tecidos de suporte da maioria dos pacientes portadores de próteses acrílicas totais ou parciais, ao longo de alguns anos de uso, acabam sofrendo algum tipo de reação inflamatória. 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 requeridas destes materiais, aquelas relacionadas com a superfície, como a rugosidade, são de grande importância clínica, já que facilitam o acúmulo de biofilme e manchamento.⁷ Estudos preconizam valores de rugosidade (Ra) próximos ou inferiores a 0,2 μm , para dificultar a adesão microbiana.¹ De acordo com alguns autores, as técnicas convencionais de acabamento e polimento das bases acrílicas das próteses, dificilmente

atingem níveis inferiores a estes valores.⁶ Entretanto, observou-se neste estudo, nível de rugosidade média de 0,02 μm para as amostras de RAAT, antes da simulação dos bochechos. Este valor está muito abaixo do valor crítico preconizado pelos estudos ($R_a \geq 0,2 \mu\text{m}$). Mesmo após a simulação de 6 meses de bochechos diários, os valores de rugosidade permaneceram menores do que 0,2 μm , apresentando valores médios de 0,04 μm , independentemente da solução enxaguatória. Da mesma maneira, para os DA de resina acrílica da marca Trilux e Vivodent e amostras de metal, os valores médios finais de rugosidade também ficaram abaixo do valor crítico preconizado, sendo respectivamente, de 0,156, 0,079 e 0,057 μm . Os materiais protéticos 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.^{8,9}

Outro valor crítico de rugosidade (R_a), é de 0,3 μm , o qual pode ser detectado quando os lábios e/ou a língua do paciente entram em contato com o material, causando desconforto.¹ Nenhum dos materiais estudados mostrou valores de alteração de rugosidade superficial acima destes limites críticos, independentemente do tipo solução enxaguatória utilizada, corroborando com outros estudos.^{45,46}

Dessa forma, apesar da alteração de rugosidade promovida pelas soluções enxaguatórias, elas não promoveram danos severos à superfície dos materiais, no período de tempo simulado neste estudo. Estas soluções por possuírem vários componentes em sua composição, tais como detergentes, emulsionantes, ácidos orgânicos, corantes e etanol, podem promover alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais. Alguns estudos comprovaram que os solventes orgânicos (como o etanol) podem alterar a dureza e a rugosidade das resinas acrílicas, principalmente quando em contato por períodos prolongados.⁵⁹ O etanol é um solvente orgânico que age como agente plastificador do PMMA, penetrando na matriz do polímero e expandindo os espaços entre a cadeia polimérica,

podendo aumentar a rugosidade da superfície das resinas e a absorção de líquidos e substâncias corantes, ocasionando maior alteração de cor.^{54,60}

A solução teste formulada à base do extrato citronela, mostrou-se segura em seu uso, no que se refere a esta propriedade, visto que somente o Listerine Tartar Control se comportou estatisticamente diferente às demais soluções testadas, para as amostras de RAAT. Para os DA, não foi possível estabelecer diferença estatisticamente significativa entre as soluções.

Como já citado, estas alterações podem ser explicadas pelo fato dos enxaguatórios conterem solubilizantes e outras substâncias que alteram a matriz e componentes do material, podendo modificar algumas propriedades físicas e mecânicas.⁵⁹ Outros tipos de análises de superfície deverão ser realizados para melhor justificar os resultados obtidos, permitindo uma melhor percepção do que cada solução efetivamente promoveu na superfície de cada material.

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

21. da Costa LF, Amaral CD, Barbirato DD, Leão AT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2017;1-11.
22. Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2010;37:829–839.
23. Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
24. Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav* 2001;74:85-99.
25. Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 2002;27:73-80.
26. Paranhos RMZF, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SCH, Ito IY, De Mattos MGC. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci* 2007;15:33-8.
27. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et.al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2012;29:838-44.
28. Moreno A, Goiato MC, Dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology* 2013;30:32-9.

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

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

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

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

QUADRO

Quadro 1 – Enxaguatórios bucais a que serão submetidas às amostras.

GRUPOS	ENXAGUATÓRIOS BUCAIS	FABRICANTE
Grupo Controle – Sem imersão	-	-
GI – 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
GII – Colgate PerioGard (produto sem etanol)	Gluconato de clorhexidina a 0,12% (digluconato formulado para uma base livre de clorhexidina 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
GIII – Colgate PerioGard (produto com etanol)	Gluconato a 0,12% (ou digluconato formulado para uma base livre de clorexidina na concentração de 0,067%) e os seguintes componentes inativos: Água, glicerina, etanol, polisorbato 20, composição aromática com sabor predominante de menta, sacarinato de sódio, CI 42090.	Colgate-Palmolive Company
GIV – Listerine Zero (produto sem etanol)	Água, thymol, menthol, metilsalicilato, sorbitol, eucaliptol, aroma (d-Limonene), lauril sulfato de sódio, Poloxamer 407, sucralose, ácido benzóico, sacarina sódica, benzoato de sódio, propileno glicol, CI 42053.	Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda
GV – Listerine TartarControl (produto com etanol)	Água, sorbitol, etanol, Poloxamer 407, sacarina sódica, ácido benzóico, eucaliptol, cloreto de zinco, thymol, metilsalicilato, benzoato de sódio, menthol, aroma, CI 42090.	Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda
GVI – Solução teste formulada com o extrato da planta <i>Cymbopogon nardus</i>	Enxaguante à 10,9% do extrato do óleo de citronela (Laudo anexo A)	Farmácia de Manipulação Apothicário

TABELAS

Tabela 1 - Análise de Variância (ANOVA) comum fator de alteração de cor da RAAT para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	df	MS	Z	P
Solução	219,525	5	43,905	4,393	0,002*
Erro	539,707	54	9,995		
Total	4025,500	60			

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

Tabela 2 - Análise de Variância (ANOVA) comum fator de alteração de cor dos DA da marca Trilux para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	<i>df</i>	MS	Z	<i>P</i>
Solução	0,518	5	0,104	0,185	0,967
Erro	30,319	54	0,561		
Total	88,892	60			

**P* < 0,05 denota diferença estatística significativa.

Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA) comum fator de alteração de cor dos DA da marca Vivodent para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	df	MS	Z	P
Solução	0,516	5	0,103	0,191	0,965
Erro	29,142	54	0,540		
Total	87,458	60			

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

Tabela 4 - Valores médios (desvio padrão) de alteração de cor das amostras de RAAT e DA (Trilux e Vivodent), de acordo com a solução de imersão.

SOLUÇÃO DE IMERSÃO	ALTERAÇÃO DE COR (ΔE)		
	RAAT	Dentes Trilux	Dentes Vivodent
GI – Saliva artificial	3,46 (1,36) B	0,92 (0,61) A	0,94 (0,43) A
GII – Periogard sem etanol	8,45 (2,53) A	1,13 (1,03) A	1,08 (1,26) A
GIII - Periogard com etanol	6,53 (3,31) AB	1,10 (0,48) A	1,08 (0,56) A
GIV - Listerine Zero	8,38 (4,20) A	0,89 (0,68) A	1,04 (0,75) A
GV – Listerine Tartar Control	8,93 (3,25) A	0,94 (0,78) A	0,91 (0,53) A
GVI – Solução teste formulada (<i>Cymbopogon nardus</i> a 10,9%)	8,52 (3,55) A	0,92 (0,79) A	0,83 (0,56) A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo Tukey's test.

Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) com um fator de alteração de rugosidade das amostras de RAAT para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	df	MS	Z	P
Solução	0,021	6	0,004	8,416	<0,001*
Erro	0,026	63	<0,001		
Total	0,157	70			

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) com um fator de alteração de rugosidade dos DA da marca Trilux para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	df	MS	Z	P
Solução	0,005	6	0,001	2,029	0,075
Erro	0,026	63	<0,001		
Total	1,747	70			

* $P < 0,05$ denota diferença significativa.

Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) com um fator de alteração de rugosidade dos DA da marca Vivodent para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	df	MS	Z	P
Solução	0,004	6	0,001	3,873	0,002*
Erro	0,012	63	<0,001		
Total	0,459	70			

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) com um fator de alteração de rugosidade das amostras de LNC para as diferentes soluções de imersão utilizadas.

Fatores de Variação	SS	df	MS	Z	P
Solução	0,002	6	<0,001	1,482	0,199
Erro	0,018	63	<0,001		
Total	0,245	70			

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

Tabela 9 - Valores médios (desvio padrão) de rugosidade (μm) da RAAT, DA (Trilux e Vivodent) e LNC, de acordo com a solução de imersão.

SOLUÇÃO DE IMERSÃO	Ra (μm)/DP			
	RAAT	Dentes Trilux	Dentes Vivodent	Metal (LNC)
Grupo controle - Sem imersão	0,023 (0,007) B	0,158 (0,015) A	0,084 (0,009) AB	0,055 (0,015) A
GI – Saliva artificial	0,027 (0,013) B	0,161 (0,027) A	0,087 (0,016) A	0,050 (0,009) A
GII – Periogard sem etanol	0,031 (0,014) B	0,162 (0,029) A	0,090 (0,018) A	0,053 (0,017) A
GIII - Periogard com etanol	0,041 (0,028) B	0,137 (0,011) A	0,074 (0,013) AB	0,068 (0,023) A
GIV - Listerine Zero	0,031 (0,014) B	0,155 (0,020) A	0,083 (0,013) AB	0,051 (0,008) A
GV – Listerine Tartar Control	0,078 (0,029) A	0,163 (0,018) A	0,068 (0,010) B	0,060 (0,023) A
GVI – Solução teste formulada (<i>Cymbopogon nardus</i> a 10,9%)	0,047 (0,025) B	0,160 (0,014) A	0,071 (0,013) AB	0,060 (0,015) A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo Tukey's test.

Anexo A

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

9. Atabek D, Sillelioglu H, Olmez A. The efficiency of a new polishing material: nanotechnology liquid polish. *Oper Dent* 2010;35:362-9.
10. Al-Rifaiy MQ. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. *Saudi Dent J* 2010;22:13-7.
11. Hassel AJ, Wegener I, Rolko C, Nitschke I. Self-rating of satisfaction with dental appearance in an elderly German population. *Int Dent J* 2008;58:98-102.
12. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Phillips' science of dental materials. 12th ed. St. Louis: Elsevier, Saunders; 2013.
13. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Impl Res* 2000;11:146–155.
14. Pedrazzi V, Escobar EC, Cortelli JR, Haas AN, Andrade AK, Pannuti CM, et al. Antimicrobial mouthrinse use as an adjunct method in peri-implant biofilm control. *Braz Oral Res* 2014;28:1-9.
15. Kracher CM, Smith WS. Oral health maintenance dental implants. *Dent Assist* 2010;79:27-35.
16. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent Bristol* 1998;26:299-304.
17. Arkell S, Shinnick A. Update on oral candidosis. *Nurs Times* 2003;99:52-3.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37:107-14.
22. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:359-83.
23. 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.
24. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:339-45.
25. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence* 2015;6:183-7.
26. Veyries ML, Faurisson F, Joly-Guillou ML, Rouveix B. Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1093-6.
27. Singh D, Kaur H, Gardner WG, Treen LB. Bacterial contamination of hospital pagers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:274-6.
28. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012;33:5967-82.

29. Rams TE, Roberts TW, Tatum H Jr, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent* 1984;51:529-34.
30. Rams TE, Feik D, Slots J. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:29-32.
31. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury* 2006;37:S3-14.
32. Renvert S, Lindahl C, Renvert H, Persson GR. Clinical and microbiological analysis of subjects treated with Brånemark or AstraTech implants: a 7-year follow-up study. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:342-7.
33. Zhuang LF, Watt RM, Mattheos N, Si MS, Lai HC, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. *Clin Oral Implants Res* 2016;27:13-21.
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;37:829–839.
35. da Costa LF, Amaral CD, Barbirato DD, Leão AT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2017;1-11.
36. Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:432-9.
37. Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav* 2001;74:85-99.

38. Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 2002;27:73-80.
39. Paranhos RMZF, Batalhão CH, Semprini M, Regalo SCH, Ito IY, De Mattos MGC. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci* 2007;15:33-8.
40. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et.al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology* 2012;29:838-44.
41. 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.
42. 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.
43. Charles CH, Cronin MJ, Conforti NJ, Dembling WZ, Petrone DM, McGuire JA. Anticalculus efficacy of an antiseptic mouthrinse containing zinc chloride. *J Am Dent Assoc* 2001;132:94-8.
44. Fine DH, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD. In vivo antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use. *J Clin Periodontol* 2005;32:335-40.

45. Chen Y, Wong RW, Seneviratne CJ, Hägg U, McGrath C, Samaranayake LP. Comparison of the antimicrobial activity of Listerine and Corsodyl on orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;140:537-42.
46. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial. *Am J Dent* 2013;26:149-55.
47. Vlachojannis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine® Products: An Update on the Efficacy and Safety. *Phytother Res* 2016;30:367-73.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.

53. 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.

Anexo B



2013 Guia para a Preparação de Manuscritos

The Journal of Prosthetic Dentistry

Atualizado em 2012 pelo Escritório de Publicação do *The Journal of Prosthetic Dentistry*

Georgia Regents University, College of Dental Medicine, Augusta, GA

Traducido por Richard C. Cardoso, D.D.S, M.S.

Assistant Professor, Section of Oral Oncology, Dept. of Head and Neck Surgery

The University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center

Índice

Sobre o <i>Journal of Prosthetic Dentistry</i> / Informações de Contato	3
Lista de Verificação para Submissão Inicial	3
Orientações de Submissão	4
Tipos de artigos	
• Artigos de Pesquisa	5
• Casos Clínicos	6
• Técnicas Dentárias	6
• Revisão Sistemática	7
• Conselhos dos Nossos Leitores	8
Instruções sobre Formato	
• Pagina de Título	8
• Abstrato	9
• Texto principal	9
• Referências	9
• Tabelas	10
Submissão de figuras	
• Tipo de arquivo/dimensões	11
• Resolução	11
• Texto dentro de imagens	12
• Gráficos	12
• Figuras coloridas	13
• Nomeação de arquivo	13
• Legendas	13
Permissões	13
Participações com empresas comerciais / produtos	14
Guia para escrever o manuscrito	
Regras gerais e sugestões	14
Elementos do estilo / Termos não aceites	15
Guia adicional de terminologia	16
Abreviaturas aprovadas para periódicos mais citado	18
Apêndice	
• I- Amostra da página de título	19
• II- Amostra página de referência	21
• III- Amostra de legenda	22

Sobre o “Journal of Prosthetic Dentistry”

Nos seus 62 anos, *The Journal of Prosthetic Dentistry* tem sido a revista líder profissional dedicada exclusivamente à odontologia protética e restauradora. É a publicação oficial de 25 organizações de prostodônticos nos EUA e internacionalmente, servindo dentistas e protéticos em prática avançada. A revista apresenta artigos originais revisados por pares sobre as mais recentes técnicas, materiais dentários, e os resultados de investigação, com fotos a cor que ilustram procedimentos passo-a-passo.

O *Journal of Prosthetic Dentistry* está incluído no *Index Medicus* e *CINAHL*, e é o jornal más citado em prostodontia, pelo número de referências citados segundo o “Journal Citation Reports”® de 2011.

The Journal of Prosthetic Dentistry
Editorial Office
Georgia Regents University
College of Dental Medicine
1120 15th St, GC3094
Augusta, GA 30912-1255

Telefone: (706) 721-4558
Fax: (706) 721-4571
E-mail: JPD@gru.edu

Website: www.prosdent.org
Submissão on-line:
<http://www.ees.elsevier.com/jpd/>

Lista de verificação para submissão inicial

- Carta de submissão
- Conflito de interesses e declaração financeira, se aplicável
- Permissão para reprodução de materiais previamente publicados, se aplicável
- O consentimento informado para fotografias de pacientes, se aplicável
- Um manuscrito em formato *Microsoft Word* que contém:
 - Página de título
 - Abstrato
 - Texto principal, (o próprio artigo)
 - Referências bibliográficas
 - Tabelas
 - Lendas de ilustrações, e
 - Figuras em formato TIFF (ver Orientações, páginas 11-13)

Orientações de Submissão

Obrigado pelo seu interesse em escrever um artigo para o *Journal of Prosthetic Dentistry*. No processo de publicação, como em odontologia, procedimentos precisos são essenciais. Sua atenção e complacência com as seguintes políticas ajudará a garantir o processamento atempado da sua submissão.

Comprimento de Manuscritos

Comprimento do manuscrito depende do tipo. Artigos de pesquisa e ciência clínicos gerais não deve exceder 10 a 12 páginas, escritos em espaço duplo (excluindo referências, legendas e tabelas). Relatórios Clínicos e Técnicas Dentárias não deve exceder 4 a 5 páginas, e conselhos dos nossos leitores não deve exceder 1 a 2 páginas. O comprimento varia de revisões sistemáticas.

Número de Autores

O número de autores é limitado a 4, inclusão *de mais de 4 deve ser justificada* na carta de submissão. (Contribuição de cada autor deve ser anotado) Caso contrário, autores acima de 4 serão listados nos agradecimentos.

Formatação Geral

Todas as submissões devem ser enviadas através do sistema de EES em Microsoft Word ou num formato compatível com Microsoft Word usando páginas de 8.5 X 11 polegadas em tamanho. As seguintes especificações deve ser seguido:

- Times Roman, 12 pt
- Espaço duplo
- Justificado à esquerda
- Margens de 1 polegada (2,5cm) em todos os lados da página
- Tabulação de meia polegada (1,25cm)
- Cabeçalhos/rodapés deve ser livre de números de páginas ou qualquer outra informação
- Referências; não deve ser numerados automaticamente (formatado).
- Defina a linguagem em MS Word para Inglês (EUA).

Tipos de Artigos

Os artigos são classificados da seguinte maneira: Relatório de Pesquisa/Casos Clínicos, Relatório Clínico, Técnica Dentária, Revisão Sistemática, ou Concelhos dos Nossos Leitores. Seções necessárias para cada tipo de artigo são listados na ordem em que devem ser apresentados.

RELATÓRIO DE PESQUISA/ESTUDO CLÍNICO

O relatório da pesquisa não deve ser mais de 10-12 páginas digitadas em espaço duplo e deve ser acompanhado por não mais de 12 ilustrações de alta qualidade. Evite o uso de forma de esboço (ou seja enumerações e/ou frases ou parágrafos com marcadores). O texto deve ser escrito em frases completas e em forma de parágrafo.

- **Abstract (Abstrato):** (aproximadamente 250 palavras): Crie um resumo estruturado com os seguintes subseções: *Statement of the Problem* (Declaração do Problema), *Objective* (Objetivo), *Materials and Methods* (Métodos e Materiais), *Results* (Resultados) e *Conclusions* (Conclusões). O abstrato deve conter detalhes suficientes para descrever o experimento e os variáveis do projeto. O tamanho da amostra, os controles, o método de medição, standardização, confiabilidade examinador, e método estatístico utilizado com nível de significância associado deve ser descritos na seção de Materiais e Métodos. Valores reais devem ser fornecido na seção de Resultados.
- **Clinical Implications (Implicações Clínicas):** Em 2-4 frases, descreva o impacto dos resultados do estudo sobre prática clínica.
- **Introduction (Introdução):** Explique o problema completamente com precisão. Resuma a literatura relevante, e identifique qualquer viés em estudos anteriores. Declare claramente o objetivo do estudo e a hipótese da pesquisa no final da introdução. Observe que, numa profunda revisão da literatura, a maioria das referências (se não todas) devem ser citadas na seção Materiais e Métodos e/ou na Introdução.
- **Materials and Methods (Materiais e Métodos):** No parágrafo inicial, forneça uma visão geral do experimento. Forneça informações completas de todos os produtos de fabricação e instrumentos utilizados, entre parênteses ou em uma tabela. Descreva o que foi medido, como foi medido, e as unidades de medida utilizadas. Liste os critérios para julgamento quantitativo. Descreva o designo experimental e variáveis, incluindo critérios definidos para controlar variáveis, standardizar os testes, a alocação de espécimes/sujeitos a grupos (método de randomização), o tamanho total da amostra, controles, calibração dos examinadores, e confiabilidade de instrumentos e examinadores. Descreva como o tamanho das amostras foi determinada (por exemplo, com a análise de força (*power analysis*)). Evite o uso de números para identificar grupos. Em vez, use abreviações ou códigos que claramente indicaram as características do grupo e assim, os grupos serão mais significativo para o leitor. Os testes estatísticos e níveis de significância associado devem ser descrito no final desta seção.
- **Results (Resultados):** Descreva com precisão e brevemente, na mesma ordem que os testes foram descritos na seção de Materiais e Métodos. Para uma listagem extensa, os dados poderão ser apresentados em forma tabular ou forma gráfica para ajudar o leitor. Para 1-way ANOVA apresente df , e valores de F e P nas áreas apropriada no texto. Para todas as outras ANOVAs, de acordo com as orientações, forneça a tabela ANOVA. Descreva os resultados e as tendências mais significativas. Texto, tabelas e figuras não devem repetir ao outro. Resultados notados como significativos devem ser validados por dados atuais e valores P .

- **Discussion (Discussão):** Discuta os resultados do estudo, em relação à hipótese e a relevante literatura. A discussão deve começar por explicar se sim ou não há suporte a rejeitar a hipótese nula. Se os resultados não concordam com outros estudos e/ou com opiniões aceitas, declare como, e porquê os resultados são diferentes. Resultados concordantes com outros estudos também devem ser declarados. Identifique as limitações do seu estudo e sugere pesquisas futuras.
- **Conclusion (Conclusão):** Liste concisamente conclusões da pesquisa que possam ser retiradas do seu estudo, não simplesmente reafirmar os resultados. As conclusões devem ser pertinentes aos objetivos e justificado pelos dados. Na maioria das situações, as conclusões são só verdade para a população do experimento. Todas as conclusões devem ser acompanhadas por análises estatísticas
- **References (Referências):** Consulte a página 9 para obter mais orientações, página 22 para amostras.
- **Tables (Tabelas):** Construir tabelas de acordo com as orientações na página 11.
- **Legends for Illustrations (Legendas para as Ilustrações):** Descreva de forma concisa cada ilustração sem diretamente duplicar o texto. Consulte a página 13 para obter mais orientações; página 23 para a página de amostra de legendas.

RELATÓRIO CLÍNICO

O relatório clínico descreve os métodos do autor para cumprir um tratamento difícil dum paciente; não deve ser mais de 4 a 5 páginas, espaço duplo, e deve ser acompanhado por não mais do que 8 ilustrações de alta qualidade. Em algumas situações, o editor pode aprovar a publicação de figuras adicionais se contribuírem significativamente ao manuscrito.

- **Abstract (Abstrato):** Forneça um curto abstrato, sem estrutura, num parágrafo que brevemente resume o problema encontrado e tratamento administrado.
- **Introduction (Introdução):** Resuma a literatura relevante para o problema encontrado, incluindo referências de tratamentos e protocolos padrão. Por favor note que a maioria das referências, se não todas, devem ser citadas na introdução e/ou na seção Relatório Clínico.
- **Clinical Report (Relatório Clínico):** Descreva o paciente, o problema com o qual ele/ela apresentou, e qualquer história médica ou odontológica relevante. Descreva as várias opções de tratamento e as razões para tratamento escolhido. Descreva completamente o tratamento, a duração do período de acompanhamento, e melhorias notáveis resultado do tratamento. Esta seção deve ser escrito no passado e em forma de parágrafo.
- **Discussion (Discussão):** Comente sobre as vantagens e desvantagens do tratamento escolhido e descreva qualquer contraindicações do tratamento. Se o texto torna repetitivo, omita a discussão.
- **Summary (Sumário):** Resume brevemente o tratamento do paciente.
- **References (Referências):** Selecione e escreva referências bibliográficas de acordo com as orientações da página 10.
- **Legends for illustrations (Legendas para as ilustrações):** Descreva de forma concisa cada ilustração sem diretamente duplicar o texto principal.

TÉCNICA DENTÁRIA

Um artigo sobre uma técnica dentária deve ser apresentada num formato de passo-a-passo, um procedimento único, útil para profissionais de odontologia. Não deve ser mais de 4 a 5 páginas digitadas, em espaço duplo, e ser acompanhado por não mais de 8 ilustrações de alta qualidade. Em algumas

situações, o Editor poderá aprovar a publicação de imagens adicionais se contribuírem significativamente ao manuscrito.

- **Abstract (Abstrato):** Forneça um curto abstrato, sem estrutura, de um parágrafo que brevemente resuma a técnica apresentada.
- **Introduction (Introdução):** Resume a literatura relevante. Inclua referências a métodos e protocolos standardizados. Por favor note que a maioria das referências, se não todas, devem ser citadas na Introdução e/ou seção Técnica .
- **Technique (Técnica):** Num formato enumerado, passo-a-passo, descreva cada passo da técnica. O texto deve ser escrito em forma ativa, em vez de forma passiva (por exemplo, “Survey the diagnostic cast” em vez de “The diagnostic cast was surveyed.”) Inclua referências para as ilustrações acompanhadas.
- **Discussion (Discussão):** Comente sobre as vantagens e desvantagens da técnica, as situações onde possam ser aplicadas, e descreva qualquer contraindicações da sua técnica. Evite alegações excessivas de eficácia. Se o texto torna-se repetitivo, omita a discussão.
- **Summary (Sumário):** Resume brevemente a técnica apresentada e suas vantagens principais.
- **References (Referências):** Selecione e escreva referências bibliográficas de acordo com as orientações da página 12.
- **Legends for illustrations (Legendas para as ilustrações):** Descreva de forma concisa cada ilustração sem diretamente duplicar o texto principal.

REVISÃO SISTEMÁTICA

O autor é aconselhado a desenvolver uma revisão sistemática no estilo e formato Cochrane. O Jornal esta transacionando de revisões de literatura para revisões sistemáticas. Para mais informações sobre revisões sistemáticas, consulte www.cochrane.org.

Um exemplo duma revisão sistemática:

Torabinejad M, Anderson P, Bader J, Brown LJ, Chen LH, Goodacre CJ, Kattadiyil MT, Kutsenko D, Lozada J, Patel R, Petersen F, Puterman I, White SN. Outcomes of root canal treatment and restoration, implant-supported single crowns, fixed partial dentures, and extraction without replacement: a systematic review. *J Prosthet Dent* 2007 Oct; 98(4):285-311.

A revisão sistemática consiste de:

- 1) Um abstrato – Um resumo usando um formato estruturado (Declaração do Problema, Objetivo, Material e Métodos e Materiais, Resultados, Conclusões).
- 2) Revisão do texto- Composta por uma introdução (estado da questão e objetivo), os métodos (Critérios de seleção, métodos de pesquisa, coleta e análise dos dados), resultados (descrição dos estudos, qualidade metodológica e análise dos resultados), discussão, conclusões dos autores, agradecimentos, e conflitos de interesse. As referências devem ser *avaliadas por pares* e seguindo o formato JPD (página 11).
- 3) As tabelas e figuras, se necessárias-- mostrando características dos estudos incluídos, especificação das intervenções em comparação, os resultados dos estudos incluídos, um registro dos estudos que foram excluídos e tabelas adicionais e números relevantes para a revisão.

CONSELHOS DOS NOSSO LEITORES

Conselhos dos nossos leitores são breves relatórios sobre procedimentos úteis ou que economizam tempo. Devem ser limitado a 2 autores, não mais do que 250 palavras, e incluem não mais de 2 ilustrações de alta qualidade. Descreva o procedimento num formato numerado de passo-a-passo, escreva o texto em forma ativa, em vez de forma passiva (por exemplo, “Survey the diagnostic cast” em vés de “The diagnostic cast was surveyed.”)

Instruções de Formato

ARRANJO da PRIMEIRA PÁGINA – Página Título (*Title Page*)

Por favor, veja o exemplo da página título no Apêndice I (página 19).

- **Título:** O título deve definir a ideia do estudo, o conteúdo do estudo, e significado clínico. Utilize letra maiúscula apenas na primeira letra da primeira palavra. Não sublinhar o título. Abreviaturas ou nomes comerciais não deve ser usado no título. Palavras como ‘new’, ‘novel’, ou ‘simple’ não são recomendados para o título.
- **Autores:** Diretamente sobre o título, escreva os nomes e títulos dos autores. Liste somente os graus acadêmicos. Por favor não use denominações de associações.
- **Instituições:** Diretamente sobre os nomes dos autores, escreva a afiliação institucional e as cidades, estados ou países (se não os Estados Unidos) em que estas instituições são localizadas. Se necessário, inclua a tradução do nome da instituição. Se os autores não são afiliados com uma instituição, por favor, liste a cidade, estado ou país (se não os Estados Unidos), em que os autores vivem.
- **Apresentação/informações de suporte financeiro e títulos:** Se a pesquisa foi apresentada antes numa reunião, escreva o nome da organização, o local, e data da reunião. Se o trabalho foi apoiado por uma bolsa de estudo ou qualquer outro tipo de financiamento, forneça o nome da organização de suporte e o número de concessão. Liste os títulos acadêmicos (por exemplo, *Assistant Professor*) e afiliações departamental de todos os autores.
- **Informações de contato:** Liste o endereço para correspondência, telefone comercial, número de fax, e e-mail do autor onde receberá a correspondência.

ABSTRATO

- O abstrato deve ser escrito numa página separada do texto principal.
- O abstrato não deve incluir abreviaturas ou informações de fabricação.

TEXTO PRINCIPAL

Cabeçalhos

- Os cabeçalhos devem contribuir a clareza do artigo e mudança de uma seção para outra (por exemplo, da discussão para conclusões).
- O uso de subtítulos podem ser apropriados para seção de Materiais e Métodos, mas é geralmente desencorajado nos Resultados e Discussão.
- Todos os cabeçalhos devem ser alinhados com a margem esquerda. Cabeçalhos principais (por exemplo, “*MATERIALS AND METHODS*”) devem ser escrito em letras maiúsculas, subtítulos (por exemplo, “*Specimen preparation*” deve ser escrito com a primeira letra maiúscula e o restante da frase em letras minúsculas.)

Informações de identificação de produto e sua manufatura

- Descreva produtos em termos genéricos. Imediatamente após a palavra, forneça as seguintes informações em parênteses: nome do produto e do fabricante; por exemplo: “*The impression was poured in Type IV stone (Denstone; Heraeus Kulzer) and related to each other with a fastsetting vinyl polysiloxane occlusal registration material (Correct VPS Bite Registration; Jeneric/Pentron, Inc).*” Por favor, note que há um ponto e vírgula após o nome do produto. Nós já não exigimos a cidade e estado/País para cada fabricante que esta informação muda com tempo e é fácil de encontrar na rede.
- Não use símbolos de marca registrada, não são consistentes com estilo do Jornal.
- Use nomes de medicamentos genéricos; os nomes comerciais podem ser mencionados em parênteses na primeira menção.

Abreviaturas

- Se abreviaturas foram utilizadas, forneça a forma expandida na primeira menção e abreviar daí em diante, por exemplo, “*fixed dental prosthesis (FDP)*”.

Referências

Referências aceitáveis e a sua colocação no documento

- A maioria das referências, se não todas, devem ser citada na introdução e/ou na seção de Materiais e Métodos. Apenas aquelas referências que foram citadas anteriormente ou que se relacionam diretamente aos resultados do estudo podem ser citados na discussão.
- Só os artigos publicados que foram revisados por pares podem ser usado como referência. Manuscritos em preparação, manuscritos submetidos para consideração e teses não publicadas não são referências aceitáveis.
- Os abstratos são considerados observações não publicadas e não são permitidos como referência a não ser que estudos de acompanhamento foram publicados em revistas revisadas por pares.
- **A referência de publicações em língua estrangeira devem ser mantidas a um mínimo (não mais que 3). Estas referências são permitidas apenas quando o artigo original foi traduzido para Inglês.** O título traduzido deve ser citado e a língua original deve ser mencionada entre parênteses na citação ao final.
- Referências de livros didáticos devem ser mantidas a um mínimo; livros didáticos muitas vezes refletem as opiniões dos seus autores e/ou editores. Quando necessário, as edições mais recentes

dos livros didáticos devem ser utilizadas de preferência. Periódicos baseados em evidência científica são preferidos.

Formatação de Referências

- As referências devem ser identificadas no corpo do artigo, com números arábicos sobrescritos. O número da referência deve ser posto após o período no final da frase.
- A lista das referências completa deve ser em espaço duplo e em ordem numérica, deve seguir a seção de conclusões mas começar numa página separada. Apenas as referências citadas no texto devem aparecer na lista das referências.
- Formatação das referências devem acordar com o estilo **Vancouver**, conforme estabelecido no "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47).
- As referências devem ser numeradas manualmente.
- Liste até seis autores. Se houver sete ou mais, após o sexto nome, adicione *et al*.
- Nome do jornal será abreviado de acordo com **Cumulative Index Medicus**. Uma lista completa de abreviaturas está disponível através do site do PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>
- Formato para artigos: forneça os sobrenomes e iniciais de todos os autores, o título do artigo, o nome do periódico; e, o ano, volume e números das página de publicação. Não utilize itálico, letras realçadas ou sublinhadas para qualquer parte da referência. Coloque um período após os iniciais do último autor, após o título do artigo, e no final da referência. Coloque um ponto e vírgula após o ano de publicação e uma vírgula após o volume. Números de emissão não são usado em estilo **Vancouver**.

Exemplo: Jones ER, Smith IM, Doe JQ. Uses of acrylic resin. J Prosthet Dent 1985; 53:120-9.

- Referências dos livros: A edição mais atual deve ser citada. Forneça os nomes e iniciais de todos os autores/editores, o título do livro, a cidade de publicação, a editora, o ano de publicação e os números das página consultadas. Não use itálico, letras realçadas ou sublinhadas para qualquer parte da referência.

Exemplo: Zarb GA, Carlsson GE, Bolender CL. Boucher's prosthodontic treatment for edentulous patients. 11th ed. St. Louis: Mosby; 1997. p. 112-23.

*Um exemplo duma página de referências pode ser encontrado na página 21.

IMPORTANTE

As referências não devem ser submetidas em Endnote ou de qualquer outro software bibliográfico. Essa formatação não pode ser editado pela Oficina Editorial ou revisores, e devem ser suprimidos ou removidos do manuscrito antes de sua submissão. As referências nem devem ser numerados automaticamente.

TABELAS

- As tabelas devem complementar, e não duplicar, o texto.

- Todas as tabelas devem ser postas no final do manuscrito, após a lista de referências e antes das Legendas. Deve haver apenas uma tabela por página. Omita linhas horizontais e verticais. Omita qualquer sombreado ou cor.
- Não liste as tabelas em partes (por exemplo, Tables Ia, Ib, *etc.*) Cada tabela deve ter o seu próprio número. Numerar cada tabela na ordem em que são mencionadas no texto.
- Forneça uma legenda concisa que descreve o conteúdo da tabela. Crie nomes para cabeçalhos e coluna descritivos. Dentro de colunas, alinhar os dados de tal forma que os pontos decimais estão numa linha reta. Use pontos decimais (períodos), e não vírgulas, para marcar lugares passado o número inteiro (por exemplo, 3.5 em vez de 3,5).
- Numa linha de baixo da tabela, defina qualquer abreviaturas utilizadas na tabela.
- Se uma tabela (ou qualquer dado dentro dela) foi publicado anteriormente; dê todo o crédito ao autor original no rodapé. Se necessário, obtenha permissão para reimprimir a tabela do autor /editor.
- As tabelas devem ser submetidas em *Microsoft Word* ou formato compatível. *Microsoft Word* é preferido. Se uma tabela foi criada em *Excel*, deve ser importados para um dos formatos referidos acima antes de submissão.

SUBMISSÃO DE IMAGENS ELECTRÔNICAS

Tipo de Arquivo

Todas as figuras devem ser enviadas arquivadas em Tagged Image File Format (TIFF). As figuras não devem ser submetidos com *Microsoft Word*, *Corel Draw*, *Harvard Graphics*, *PowerPoint*, ou outros formatos de software de apresentação. Desenhos ou outros trabalhos de arte são melhores submetidos no formato original como *EPS (Encapsulated PostScript)*, *Adobe Illustrator*, *InDesign*, *etc.* **Antes de submissão, deve ser guardado como um .TIFF.**

Especificações do Arquivo da Imagem

Dimensões da figura deve ser ao mínimo de 4 × 6 polegadas (10 X 15 cm).

Todas as figuras devem ser do mesmo tamanho (o mesmo tamanho físico), a não ser que o tipo da imagem proíbe ser do mesmo tamanho das outras figuras dentro do manuscrito, como no caso duma radiografia panorâmica ou radiografias peri-apical, imagens SEM, ou gráficos e capturas de tela. Não marque nos rostos das figuras com letras ou números para indicar a ordem em que as figuras devem aparecer; tais legendas serão postas durante o processo de publicação.

Resolução

As fotos devem ser de qualidade profissional e de alta resolução. A seguir estão as orientações de resolução:

- Fotografias em preto-e-branco ou a cores devem ser criados e guardados no mínimo de 300 pontos por polegada (dpi). (Note: Uma imagem de 4X6 polegadas com uma resolução de 300 dpi será

aproximadamente 6 megabytes. Uma figura de menos de 300 dpi não deve ser aumentada artificialmente a 300 dpi, a qualidade e resolução resultante será pobre.

- ☐ Desenhos de linhas devem ser criados e guardado em 1200 dpi.
- Um trabalho artístico em combinação (uma ilustração que contem ambas fotografias e desenho de linha) deve ser criado e guardado em 600-1000 dpi.
- ☐ Claridade, contraste, e a qualidade deve ser uniforme entre as partes de uma figura multiparte, e entre todas as figuras dentro do manuscrito.
- Figuras compostas (várias imagens combinadas em um único composição) não são aceitáveis. Cada parte da imagem deve ser 4 × 6 polegadas, com 300 dpi.
- O fundo da imagem deve ser uniforme, sem textura, azul médio quando possível.

Texto dentro de imagens

Se texto é para aparecer dentro duma figura, versões marcadas e não marcadas devem ser fornecida. O texto que aparece nas versões marcadas devem ser em **fonte Ariel e ao mínimo 10 pt em tamanho**. O texto deve ser dimensionado para facilitar legibilidade, se a figura é reduzida para produção no Jornal. As letras devem ser em proporção com desenho, gráfico ou fotografia. O tamanho de fonte deve ser consistente entre cada figura, e para todas as figuras. Note que os títulos e subtítulos não devem aparecer no arquivo de figura, mas serão fornecidas no texto manuscrito (ver Legendas de Figuras, abaixo).

Se uma chave para uma ilustração requer obras de arte (linhas de tela, pontos, símbolos especiais), a chave deve ser incorporada no desenho, em vez de ser incluída na legenda. Todos os símbolos devam ser feitos profissionalmente, devem ser visível contra o fundo da imagem, e ser de proporção legível se a ilustração é reduzida para publicação.

Todas as fotografias de imagens de microscópicas devem ter uma barra de medida e unidade de medida na imagem.

Figuras em Cor

Ilustrações coloridas podem ser submetidas quando o seu uso aumenta consideravelmente o valor do manuscrito. **O editor tem a autoridade final para determinar se as ilustrações coloridas fornecem uma apresentação mais eficaz.** Geralmente, um máximo de 8 figuras são aceites para um relatório clínico e artigos de técnica dentária, e 2 figuras são aceites para conselhos para nosso leitores. Mas, o Editor pode aprovar a publicação de figuras adicionais, se elas contribuem significativamente para o manuscrito.

Figuras clínicas devem ser de cor equilibrada. Imagens coloridas devem ser em CMYK (Ciano/Magenta/Amarelo/Preto) formato de cor invés de RGB formato de cor (vermelho/verde/azul).

Gráficos

Os gráficos devem ser numerados como figuras e o enchimento nos gráficos de barras deve ser distinto e sólidos; sombreamento e desenhos devem ser evitada. Linhas grossas e sólidas devem ser usadas e em

letras realçadas e sólidas. **Fonte Times New Roman é o preferido.** Coloque letras num fundo branco e evite o reverso (letras brancas sobre um fundo escuro). **Imagens de 1200 dpi devem ser fornecidas, se forem preto e branco.**

A Jornal reserva o direito de uniformizar o formato dos gráficos e tabelas.

Nomeação de Arquivos

Cada figura deve ser numerados de acordo com a sua posição no texto (Figure 1, Figure 2, e assim), usando algarismos arábicos. Os arquivos das imagens electrónicas devem ser nomeados de modo que o número da figura e formato pode ser facilmente identificado. Por exemplo, figura 1 no formato TIFF deve ser nomeado *fig1.tif*. Figuras com várias componentes devem ser claramente identificáveis pelos nomes de arquivo: Figura 1A, Fig 1B, Fig 1C, *etc.*

No artigo, referência claramente cada ilustração, incluindo o seu número entre parênteses no final da frase apropriada antes de fechar pontuação. Por exemplo: "The sutures were removed after 3 weeks (Fig. 4)."

Legendas de Figuras

As legendas das figuras devem aparecer no texto do manuscrito numa página separada após as Referências e Tabelas e referências devem aparecer sobre o título "Legends". O estilo do Jornal requer que os artigos (*a*, *an*, *e the*) são omitidos nas legendas de figuras e tabelas.

Se uma ilustração é tirada de material já publicado, a legenda deve dar todo o crédito a autor original (consulte Permissões).

Os autores são obrigados a revelar se ilustrações foram modificados em qualquer forma.

PERMISSÕES

- Todo o material citado deve ser claramente marcado com aspas e uma referência numérica. Se mais de 5 linhas são citados, uma carta de autorização deve ser obtida do autor e editor do material citado.
- Todos os manuscritos são submetidos para um software que identifica semelhanças entre o manuscrito submetidos e trabalhos anteriormente publicados.
- Se as citações são mais do que um parágrafo de comprimento, abra aspas no início de cada parágrafo e fecha aspas perto apenas no último parágrafo.
- Escreva todo o material citado exatamente como aparece na publicação original, sem alterações em ortografia ou pontuação. Indique o material omitido numa citação com reticências (três pontos) para omissão de material dentro de uma frase, 4 pontos para o material omitido após o fim numa frase.
- As fotografias que incluem os olhos dum paciente, o paciente deve assinar um consentimento autorizando o uso de seu/sua foto no Jornal. Se tal permissão não foi obtido, os olhos serão bloqueados com barras pretas na publicação.
- As ilustrações que são reimpressas ou emprestadas de outros artigos ou livros publicados não podem ser utilizados sem a permissão do autor original e editor. O autor do manuscrito deve garantir essa permissão e enviá-la para revisão. Na legenda da ilustração, forneça a citação completa da fonte original entre parênteses.

INTERESSE COMERCIAL EM EMPRESAS E/OU PRODUTOS

- Autores não podem diretamente ou indiretamente fazer reclame aos equipamentos, instrumentos ou produtos em que eles têm um investimento pessoal.
- Declarações e opiniões expressadas nos manuscritos são as dos autores e não necessariamente aqueles dos editores. Os editores não assumem qualquer responsabilidade por tais materiais. Os editores não garantem ou endossam qualquer produto ou serviço anunciado no jornal; os editores não garantem qualquer alegação feita pelo fabricante sobre esse produto ou serviço.
- Autores devem divulgar qualquer interesse financeiro que eles podem ter nos produtos mencionados no artigo. Esta divulgação deve ser mencionada após a seção das conclusões.

Orientações de Escrita

REGRAS GERAIS E SUGESTÕES

- Autores que sua língua materna não é inglês devem obter a assistência dum especialista em escrita científica e inglês antes de submeter seu manuscrito. Manuscritos que não contem os padrões de linguagem básica serão retornados antes de revisão.
- Jornal não usa linguagem na primeira pessoa (*I, we, us, our, etc.*). "*We conducted the study*" pode facilmente alterado para "*The study was conducted.*"
- Evite o uso de termos subjetivos, tais como "*extremely*", "*innovative*" *etc.*
- O Jornal utiliza a vírgula serial, uma vírgula que é posta antecede da conjunção antes do último artigo numa lista de três ou mais: "*The tooth was prepared with a diamond rotary instrument, carbide bur, and carbide finishing bur.*"
- Preferimos a forma não possessiva de epônimos: "*The Tukey Test*" em invés de "*Tukey's Test*", "*Down Syndrome*" em vez de "*Down's Syndrome*" assim por diante.
- Descreva os procedimentos experimentais, tratamentos, e resultados no tempo passivo. Tudo o resto deve ser escrito numa voz ativa.
- Descreva os dentes pelo seu nome (por exemplo, Maxillary right first molar), não seu número.
- Hífens não são usados para sufixos e prefixos comuns, a não ser que o seu uso é fundamental para compreender a palavra. Alguns prefixos com os quais nós não usamos hífens incluem: *pre-*, *non-*, *anti-*, *multi-*, *auto-*, *inter-*, *intra-*, *peri-*.
- Elimina o uso de *i.e.* ou *e.g.*; eles não são consistentes com o estilo do Jornal.
- É geralmente melhor paráfrase a informação duma publicação em vez de usar citações diretas. Parafraseando economiza espaço. A exceção é uma citação direta que é invulgarmente pontiagudo e concisa.
- As palavras compridas com abreviaturas padrões (como em *TMJ* para *temporomandibular joint*) são usadas frequentemente, use a palavra completa e forneça a abreviatura entre parênteses. Use a abreviatura de lá em frente. Acrônimos comuns devem ser definidos na primeira menção.
- Nós não usamos itálico para palavras estrangeiras como "*in vivo*", "*in vitro*"
- Abreviar unidades de medida sem um ponto no texto e nas tabelas (*9 mm*). Por favor, introduza um espaço não separável entre todos os números e suas unidades (*100mm*, *25MPa*) exceto antes % e °C. Nunca deve haver um hífen entre o número e a abreviatura ou símbolo, exceto quando em forma adjetiva (*100-mm span*).

- Escreva a palavra completa "*degree*" quando fala sobre anglos. Use o símbolo de grau somente para temperatura.
- Para os resultados estatísticos comuns P, α , β omita o zero antes do ponto decimal como não pode ser maior que 1.
- Nomes proprietários funcionam como adjetivos. Substantivo devem ser fornecido após o uso como em *Vaseline petroleum jelly*. Sempre quando possível, use apenas o termo genérico.

ALGUNS ELEMENTOS DO ESTILO DE ESCRITA EFICAZ

- *Palavras curtas*. Palavras curtas são preferíveis as palavras longas se a mais curta é igualmente precisa.
- *Palavras conhecidas*. Os leitores querem informações que eles podem compreender facilmente e rapidamente. Palavras simples, familiares fornecem clareza e impacto.
- *Palavras específicas, em invés de palavras gerais*. Termos específicos identificam o significado e criam “palavras fotos”; termos gerais podem ser difusas e aberta a interpretações variadas.
- *Abertura concisa*. Mergulhe no seu assunto no primeiro parágrafo do artigo.
- *Uso limitada de modificação de palavras e frases*. Verifique seus adjetivos, advérbios, e frases preposicionais. Se eles não são necessários, removê-los.
- *Repetição desnecessária*. Uma ideia pode ser repetida para dar ênfase — contanto que a repetição é eficaz.
- *Comprimento de frases*. Vinte palavras ou menos são recomendado. Frases sem coerência ou cheia de orações subordinadas e outros modificadores são difíceis de ler e podem causar que os leitores percam sua linha de raciocínio. Frases curtas devem, no entanto, ser equilibradas com aquelas pouco maiores para evitar a monotonia.
- *Parágrafos*. Separar seções longas em parágrafos, mas evite parágrafos de uma única frase.
- *Coibição*. Escritores que usam palavras extravagantes ou exageram sua proposição ou conclusões desacreditam de si mesmos. Os fatos falam por si.
- *Declare claramente as conclusões*. Se não sabe algo, diga.

TERMOS CENSURÁVEIS

A seguir são termos selecionados censuráveis e seus substitutos adequados. Para obter uma lista completa de terminologia protodônticas aprovadas, consulta a oitava edição do Glossary of Prosthodontic Terms (J Prosthet Dent 2005; 94:10-92).

Ou visite JPD <http://www.prosident.org> e clique em Collections/Glossary of Prosthodontic Terms.

Incorreto	Correto
Alginate	Irreversible hydrocolloid
Bite	Occlusion
Bridge	Partial fixed dental prosthesis
Case	Patient, situation, or treatment as appropriate
Cure	Polymerize
Final	Definitive
Freeway space	Interocclusal distance
Full denture	Complete denture
Lower (teeth, arch)	Mandibular
Model	Cast
Modeling compound	Modeling plastic impression compound
Muscle trimming	Border molding

Overbite, overjet
Periphery
Post dam, postpalatal seal
Prematurity
Saddle
Study model
Upper (teeth, arch)
X-ray, roentgenogram

Vertical overlap, horizontal overlap
Border
Posterior palatal seal
Interceptive occlusal contact
Denture base
Diagnostic cast
Maxillary
Radiograph

Além disso, a palavra “*specimen*” deve ser usado em invés de “*sample*” quando se refere a um exemplo considerado típico de sua classe.

Orientações Adicionais de Terminologia

Acrylic

Uma forma adjetivo que requer um substantivo, como em *acrylic resin*.

Affect, Effect

Affect é um verbo; *effect* é um substantivo.

African American

É preferido sobre *Negro* ou *Black* em ambas formas adjetiva (*African American patients*) e substantivo (... *of whom 20% were African American*).

Average, mean, median

Mean e *average* são sinônimos. *Median* refere-se ao ponto médio dum intervalo de itens; o ponto médio tem muitos itens acima como abaixo.

Basic

Como *fundamental*, esta palavra é muitas vezes desnecessário. Um exemplo de uso desnecessário: *Dental Implants consist of two basic types: Subperiosteal and endosteal*.

Between, among

Use *between* quando duas coisas são envolvidas e *among* quando há mais de dois.

Biopsy

Esse substantivo não deve ser usado como um verbo. *A biopsy was performed on the tissue*, em vez de: *The tissue was biopsied*.

Centric

Um adjetivo que requer um substantivo, como em *centric relation*.

Currently, now, at present, etc.

Essas expressões são muitas vezes desnecessárias, como em: *This technique is currently being used*.

Data

Use forma plural, como em: *The data were...*

Employ

Não deve tornar-se numa variação de *use*; como em *This method is employed...*

Ensure

Preferido sobre *insure* no senso de ter certeza.

Fewer, less

Use *fewer* com substantivos que podem ser contados (*fewer patients were seen*) e *less* com substantivos que não podem ser contados (*less material was used*).

Following

After é preferido.

Imply, infer

O falador *implies*; o ouvinte *infers*.

Incidence

O número de casos de doença que ocorre num determinado tempo; muitas vezes é confundida com *prevalence* (o número total de casos duma doença numa determinada região).

Majority

Significa mais de metade, use *most* quando quer dizer quais todos.

Male, female

Para humanos adultos, use *men* e *women*. Para meninos, use *boys* e *girls*.

Must, should

Must significa que o curso de ação é essencial. *Should* é menos forte e significa que um curso de ação é recomendado.

Numbers

Soletrar números usados em títulos ou cabeçalhos e para os números no início duma frase. A versão escrita também pode ser preferível numa série de números consecutivos que podem confundir o leitor (por exemplo, 2 3.5-inch disks deve ser escrito *two 3.5-inch disks*). Em todos os outros casos, use algarismos árabes.

Orient

Forma própria: evite *orientate*.

Pathologic

Use em vez de *pathological*. Outras palavras em que o suffixo *-al* foi descontinuado incluem *biologic*, *histologic*, e *physiologic*.

Pathology

O estudo de doença; muitas vezes confundido com *pathosis* (o estado de doença).

Percent

Use o sinal de percentagem no texto, como em *The distribution of scores was as follows: adequate, 8%; oversized, 23%; and undersized, 69%*. Mas soletrar para quando a percentagem abre uma frase, como em *Twenty percent of the castings...*

Prior to

Before é preferido.

Rare, infrequent, often not, etc.

Sempre que possível, esses termos vagos devem ser acompanhada por um número específico.

Rather

Como *very*, esta palavra deve ser evitada.

Regimen

Refer-se a um programa planejado para tomar medicação, dieta, exercício, etc. Não deve ser confundido com *regime*, ou seja, um system de governo ou gestão.

Symptomatology

A ciência ou o estudo dos sintomas; esta palavra não é um sinónimo para a palavra *symptoms*.

Technique

Preferida sobre *technic*.

Using

Evite o pendendo modificador em frases tais como *The impression was made using vinyl polysiloxane impression material*. Escreva em vez *with* ou *by using*.

Utilize

Use é preferido.

Vertical

O adjetivo que precisa um substantivo, como em *vertical relation*.

Via

Use *through*, *with*, ou *by means of*.

White

Preferido sobre *Caucasian*. Isso só é verdade se o paciente for da região do Cáucaso da Europa do leste. Se não, use o termo *white* para descrever o paciente.

Abreviaturas Aprovadas para Jornais Geralmente Citadas

Porque *The Journal of Prosthetic Dentistry* é publicada não só em forma escrita, mas também on-line, os autores devem usar as abreviaturas de PubMed padrão para títulos de periódicos. Se uma alternativa ou uma abreviações não é usada, as referências não serão ligadas na publicação on-line. Uma lista completa de abreviaturas padrões está disponível através do PubMed-site:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>.

Acta Odontologica Scandinavica	Acta Odontol Scand
American Journal of Orthodontics	Am J Orthod
Angle Orthodontist	Angle Orthod
British Dental Journal	Br Dent J
Cleft Palate Journal	Cleft Palate J
Dental Clinics of North America	Dent Clin North Am
Dental Digest	Dent Dig
Dental Practitioner and Dental Record	Dent Pract Dent Rec
Dental Progress	Dent Prog
Dental Survey	Dent Surv
International Dental Journal	Int Dent J
International Journal of Oral and Maxillofacial Implants	Int J Oral Maxillofac Implants
International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry	Int J Periodontics Restorative Dent
International Journal of Prosthodontics	Int J Prosthodont
Journal of the American College of Dentists	J Am Coll Dent
Journal of the American Dental Association	J Am Dent Assoc
Journal of Dentistry for Children	J Dent Child
Journal of Dental Education	J Dent Educ
Journal of Dental Research	J Dent Res
Journal of Endodontics	J Endod
Journal of Oral Rehabilitation	J Oral Rehabil
Journal of Oral Surgery	J Oral Surg
Journal of Periodontology	J Periodontol
Journal of Prosthetic Dentistry	J Prosthet Dent
Journal of Prosthodontics	J Prosthodont
Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology	Oral Surg Oral Med Oral Pathol
Quintessence International	Quintessence Int

Apêndice I – Amostra de Página de Título

Collagen tube containers in alveolar ridge augmentation

Robert K. Gongloff, DMD,^a and Richard Lee, DDS^b

School of Dentistry, University of California-San Francisco; Veterans Administration Medical Center, San Francisco, Calif

Supported by grant No. 9099-02 from the Veterans Administration.

Presented at the International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons annual meeting, Vancouver, British Columbia, Canada, May 2012.

^aChief, Oral and Maxillofacial Surgery, Veterans Administration Medical Center; and Associate Clinical Professor, Department of Prosthodontics, University of California-San Francisco School of Dentistry.

^bResident, Department of Prosthodontics, University of California-San Francisco School of Dentistry.

Corresponding author:

Dr Richard K. Gongloff

Dental Service 160

Veterans Administration Medical Center

123 Main St

San Francisco, CA 94121

E-mail: gongloff@hotmail.com

Acknowledgments

The authors thank...

[NOTE: Agradecimentos devem aparecer no final da página de título, em vez do texto do manuscrito.]

APÊNDICE II- AMOSTRA DA PÁGINA DE REFERÊNCIAS

REFERENCES

1. Conrad HJ, Seong WJ, Pesun IJ. Current ceramic materials and systems with clinical recommendations: a systematic review. *J Prosthet Dent* 2007;98:389-404.
2. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999;20:1-25.
3. Sailer I, Behr A, Ilser J, Gauckler LJ, Luthy J, Hammerle C. Five-year clinical results of zirconia frameworks for posterior fixed partial dentures. *Int J Prosthodont* 2007;20:383-8.
4. McLean JW, von Fraunhofer JA. The estimation of cement film thickness by an in vivo technique. *Br Dent J* 1971;131:107-11.
5. Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's restorative dental materials*. 12th ed. St. Louis: Elsevier; 2006. p. 450-62.
6. Rosenstiel SF, Land MF, Fujimoto J. *Contemporary fixed prosthodontics*. 4th ed. St. Louis: Elsevier; 2006. p. 431-65.
7. Drummond JL. Ceramic behavior under different environmental and loading conditions. In: Eliades G, Eliades T, Brantley WA, Watts DC, editors. *Dental materials in vivo: aging and related phenomena*. Chicago: Quintessence; 2003. p. 35-45.
8. International Organization for Standardization. ISO-7785-2. Dental handpieces – Part 2: straight and geared angle handpieces. Geneva: ISO; 1995. Available at: <http://www.iso.org/iso/store.htm>
9. American National Standards Institute/American Dental Association. ANSI/ADA Specification No. 69. Dental ceramic: 1999. Chicago: American Dental Association; 1999. Available at: http://www.ada.org/prof/resources/standards/products_specifications.asp
10. CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). Colorimetry - technical report. CIE Pub. No. 15, 3rd ed. Vienna: Bureau Central de la CIE; 2004.

LEGENDS

Fig. 1. Device that simulated mandible with 2 implants and ball abutments. Vise clamping implant blocks at predetermined angulation; note angled blocks.

Fig. 2. Aluminum split mold overdenture analog, showing single spherical attachment embedded in acrylic resin in one of its receptacles.

Fig. 3. Graph showing retention values (peak loads), above x axis; and insertion values (valley loads), below x axis. A, Maximum retention load (N). B, Minimum retention load (N). C, Maximum insertion load (N). D, Minimum insertion load (N).

Fig. 4. Peak retentive load (N) as function of cycle number.

Fig. 5. Scanning electron microscope image ($\times 100$ magnification) of Preci Clix attachments after cyclic testing. A, Group 0-0: Note even, circumferential, light wear. B, Group 15-15: Note permanent deformation on lateral aspect of plastic insert, uneven wear.

Anexo C



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Oleo De Citronela	Data de Análise:	03-05-2016
Lote Interno:	16A14-B020-001592	Lote Fabricante:	05/12
Data de Fabricação:	05-12-2015	Data de Validade:	05-12-2017
Origem:	Brasil	Procedência:	Brasil
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	001592

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	-	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Líquido amarelado, com odor característico.	Conforme		Fabricante
Índice de Acidez	$\leq 3,0$	2,35		Fabricante
Cinzas Sulfatadas	$\leq 0,10$	0,03	%	Fabricante
Índice de Refração	1,445 - 1,475	1,4560		Fabricante
Densidade Relativa *	0,860 - 0,896	0,862	g/mL	Fabricante
Cromatograma	Conforme Padrão	Conforme padrão		Fabricante
Teor de Citronelal	$\geq 70,0$	70	%	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 ()


Responsável Técnico Substituto
Olivia Neiva Mesquita Mendes
CRF - GO Nº 5227


Responsável Técnico
João Paulo Sartin Mendes
CRF - GO Nº 7355


Farmacêutica Responsável
Laís Caroline de Oliveira Costa - CRF - SP Nº 74.121
Dúvidas e informações complementares, favor ligar :
(11) 4785 - 5643

Fim do Documento

Para formulação do enxaguatórios a base de CN, utilizou-se a fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Hipoteticamente, para a dosagem de 5000 µL do enxagutório à base de CN a 10,9% (a partir da solução de ≥70% de citronelal), necessitaria de realizar os seguintes cálculos:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$70\% \times V_1 = 10,9\% \times 5000 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 778,57 \mu\text{L do óleo essencial de CN } (\geq 70\% \text{ citronelal})$$

Para chegar à quantidade de H₂O necessária, bastasse subtrair o volume final com o volume de V_1 , como podemos ver abaixo:

$$V_1 = 778,57$$

$$5000 \mu\text{L} - 778,57 \mu\text{L} = 4.221,43 \mu\text{L}$$

Portanto, para 5 mL do enxaguatório à base de CN à 10,9%, necessitaríamos de 778,57 µL de CN para 4.221,43 µL de H₂O.

Anexo D



TRIGLICÉRIDES DE ÁCIDO CÁPRICO CAPRÍLICO (TACC)

São ésteres de glicerol purificados com cadeia de ácidos graxos média e saturados, resultam da reação de C8-C10 com Glicerina. Embora baseados em ingredientes de origem vegetal, os MCT óleos são muito estáveis quanto a oxidação. Os MCT óleos são facilmente biodegradáveis. Sua cor clara, gosto suave e falta de odor são alguns exemplos dos benefícios oferecidos pelos MCT óleos.

Como um ingrediente ativo e/ou carregador inerte, os MCT óleos apresentam uma viscosidade relativamente baixa comparado com óleos vegetais. Embora os MCT óleos não se comportem como gorduras convencionais, em muitos casos eles ainda conservam as características típicas de um lipídio.

Características

- Suave sabor e inodoro
- Grande miscibilidade e solubilidade
- Estável contra a oxidação
- Baixa viscosidade e alta lubrificação
- Derivado proveniente de origem vegetal
- Excelente espalhabilidade
- Metabolismo único

Benefícios

- Não interfere em odores das preparações.
- Ampla compatibilidade com muitas drogas em diferentes formulações.
- Melhora os resultados, quando usado como carreador no lugar dos óleos vegetais.
- Proveitoso para lubrificação.
- Substituto natural para o óleo mineral com grande variedade de aplicações.
- Eficaz emoliente para aplicações tópicas.

Sugestões de aplicação

Propriedades:

- 01 - Dissolvente para preparações
- 02 - Alternativo para Óleo Vegetal e Mineral
- 03 - Alto poder de espalhamento (emoliente)
- 04 - Caráter oleoso

Aplicações mais usuais:

- 01 - Emulsões corporais
- 02 - Creme Emoliente
- 03 - Bronzeador
- 04 - Batons: melhora sensível da espalhabilidade do produto.

Cremes e Loções

A superior espalhabilidade e penetração, características dos MCT óleos, combinada com suas propriedades solventes fornecem ao formulador a oportunidade de criar produtos com características únicas. Estes óleos são não-oclusivos, permitindo a evaporação da água.

Farmacêutica

Os MCT óleos são usados como solventes ou meios de suspensão para várias drogas. Eles podem ser esterelizados à quente e fornecem, se assim desejar um certo efeito de armazenagem do ativo quando injetado entre o músculo e o tecido.

A - Solvente, como carreador em formulações líquidas.

B - Lubrificante de Capsulas gelatinosas moles

C - Usado para a formulação de drogas lipossolúveis, solubilizante de vitaminas oleosas e soluções com base oleosa, bom auxiliar para suspensão em óleo.

Concentração de uso

De 1 a 10% ou de acordo com a necessidade da formulação.

Características

Solvente, Carreador,
Lubrificante,
Emoliente,
Coadjuvante de cobertura,

Benefícios

Xaropes, cápsulas gelatinosas.
Cápsulas gelatinosas moles.
Preparações tópicas.
Pastilhas, comprimidos, tabletes.

Referências Bibliográficas

Material Fabricante.

Anexo E

Utilizando-se 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). Em seguida o conjunto lâmina de vidro e matriz metálica (Fig. 2) foi incluído em mufla (Vipi STG; VIPI Produtos Odontológicos). Para isso, a superfície interna da base da mufla foi isolada com vaselina em pasta, sendo preenchida em seguida com gesso especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind e Com Ltd.), seguindo a proporção de 100 g de pó para 19 ml de água, espatulado por 1 minuto e vertido sob vibração constante (Fig. 3A). Após a cristalização do gesso, outra 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) (Fig. 3B). A contra-mufla foi posicionada e, sobre a superfície desta última lâmina de vidro, foi vertido gesso especial tipo IV (Fig. 4A). Em seguida, a mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH, Midas Dental Produtos Ltda) 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). A resina acrílica termopolimerizável (VipiCril Plus, VIPI Produtos Odontológicos - 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, e foi 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. Assim sendo, realizou-se então o desgaste da lateral da amostra com uma broca maxicut para remoção de excessos, seguido de um banho de água corrente e deixadas ao ar

livre para secagem (Fig. 6). Em seguida 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 finalizados com solução diamantada em disco de feltro (Fig. 7). 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, - 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.



Fig. 1. Matriz metálica.

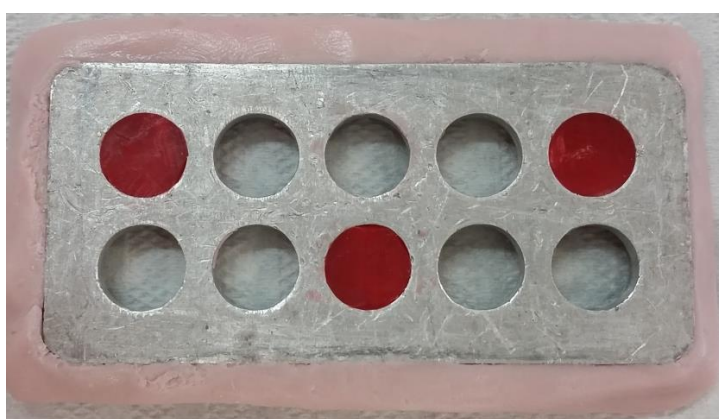


Fig. 2. Conjunto lâmina de vidro e matriz metálica.

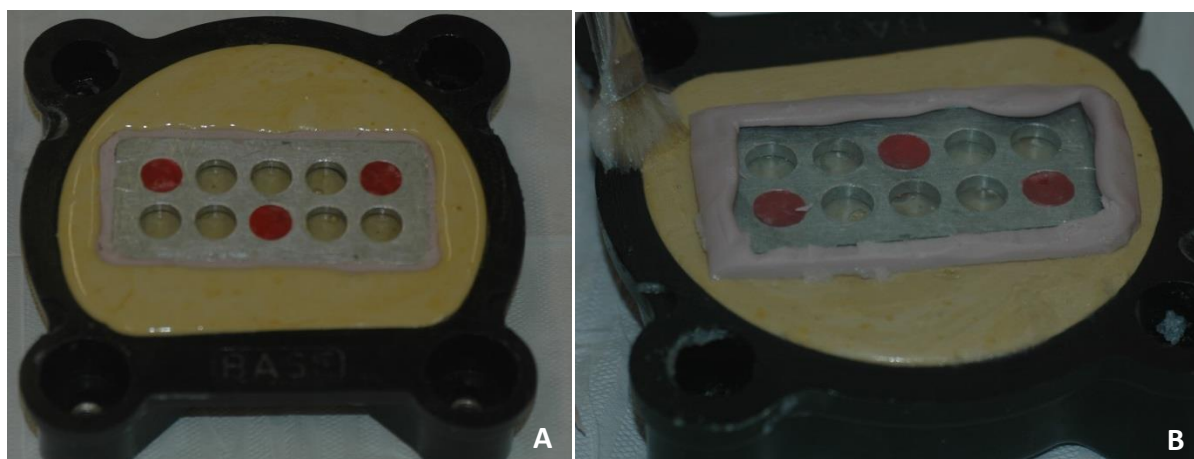


Fig. 3. (A) Inclusão do conjunto matriz/lâmina de vidro. **(B)** Outra lâmina de vidro posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com silicone Zetalabor.

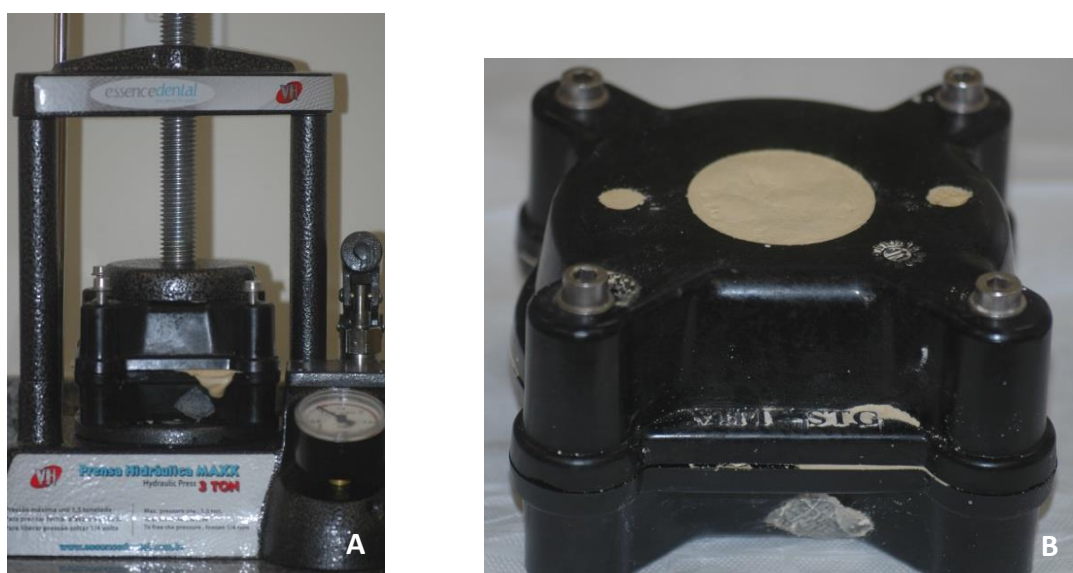


Fig. 4. (A) Prensa hidráulica de bancada. **(B)** Mufla preenchida com gesso especial tipo IV.



Fig. 5. Resina acrílica termopolimerizável.



Fig. 6. Amostras de resina acrílica.



Fig. 7. Amostra de RAAT após acabamento e polimento.



Fig. 8. Padronização da espessura das amostras.

Anexo F

Inicialmente foram confeccionados os padrões de cera (Rainbow branca opaca RW-02 – Ceras Rainbow Ltda) utilizando uma matriz em acrílico produzida sob medida (Fig. 1), com furos de 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Foi então vertida cera derretida com o auxílio de um gotejador (Fig. 2), até que os espaços fossem preenchidos, com auxílio de uma placa de vidro lisa como anteparo (Fig. 3). Após o resfriamento da cera, os excessos foram retirados com auxílio de um cartão duro, a fim de deixar todos os padrões de cera na espessura da matriz (Fig. 4). Em seguida os padrões (Fig. 5A) foram unidos aos *sprues* (Babinete, Fig. 5B) para que então este conjunto fosse levado ao anel de fundição de silicone (Fig. 6). Em seguida, o conjunto foi isolado com um redutor de tensão superficial (Surfacer, Polidental) para evitar bolhas na interface revestimento-cera, e assim o revestimento fosfatado (Calibra Express, VIPI Produtos Odontológicos) foi dosado de acordo com as especificações do fabricante e espatulado em um misturador pneumático (Turbomix, EDG) e vertido (Fig. 7) sobre o anel. Após a presa do bloco de revestimento (Fig. 8), o mesmo foi colocado em forno a 250°C por 40 minutos, e posteriormente a temperatura foi sendo aumentada, na constância de 7°C por minuto até atingir 875°C para a queima completa da cera. Em paralelo foi realizada a fundição da liga de níquel-cromo em cadinho com o auxílio de um maçarico (EDG), para que então a liga fosse injetada no interior do bloco de revestimento através de uma centrífuga (C1, EDG). Em seguida, esperou-se o bloco atingir a temperatura ambiente para a realização da desinclusão e retirada dos padrões fundidos (Fig. 9A). Para a limpeza das amostras e remoção da camada superficial oxidada foi realizado o jateamento (Profissional Jet, EDG) com partículas de óxido de alumínio de 50 µm de diâmetro (Bioart). O recorte das amostras (Fig. 9B) foi realizado com o auxílio de um disco de carborundum. A lateral das amostras foi regularizada com uma pedra trimmer em peça reta, seguido de uma borracha para o brilho. Uma das superfícies planas das amostras foi submetida ao polimento (Fig. 10) em uma politriz universal semi-automática (Arotec S.A. Ind Com), utilizando-se lixas

metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 - Buehler). Em seguida, foi realizada a planificação e padronização da espessura das amostras na faixa de 2,8 a 2,9 mm, utilizando uma lixa de granulação 150 com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Fig. 11). 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 do metal, e posteriormente foram deixadas ao ar livre para secagem.

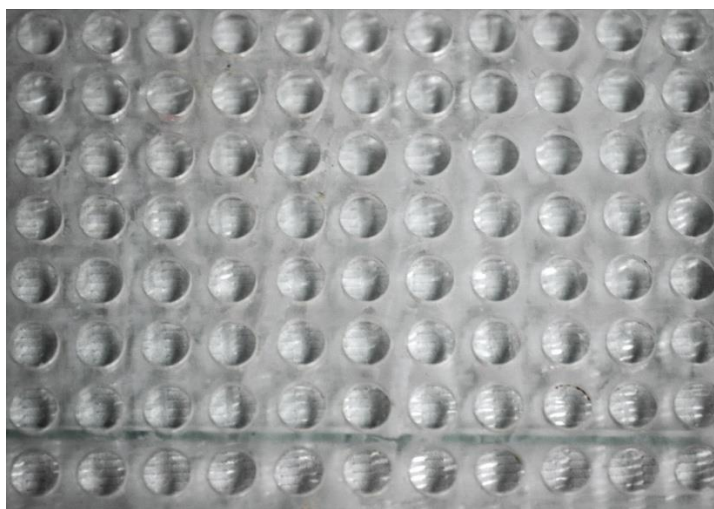


Fig. 1. Matriz para confecção dos padrões em cera.

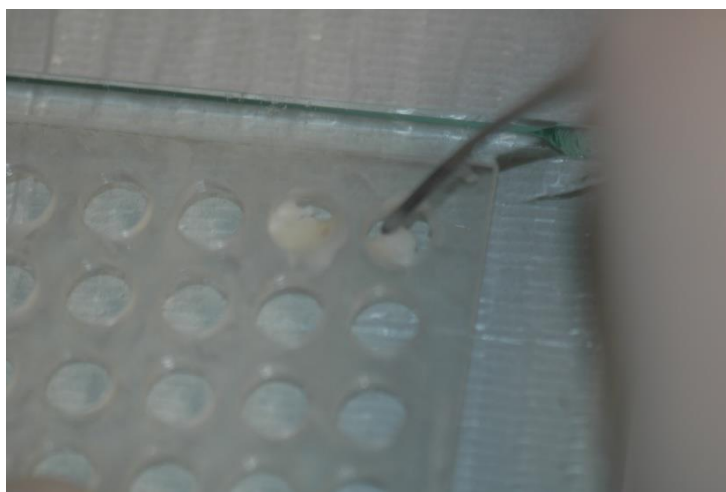


Fig. 2. Gotejamento da cera nos espaços com uma placa de vidro como anteparo.

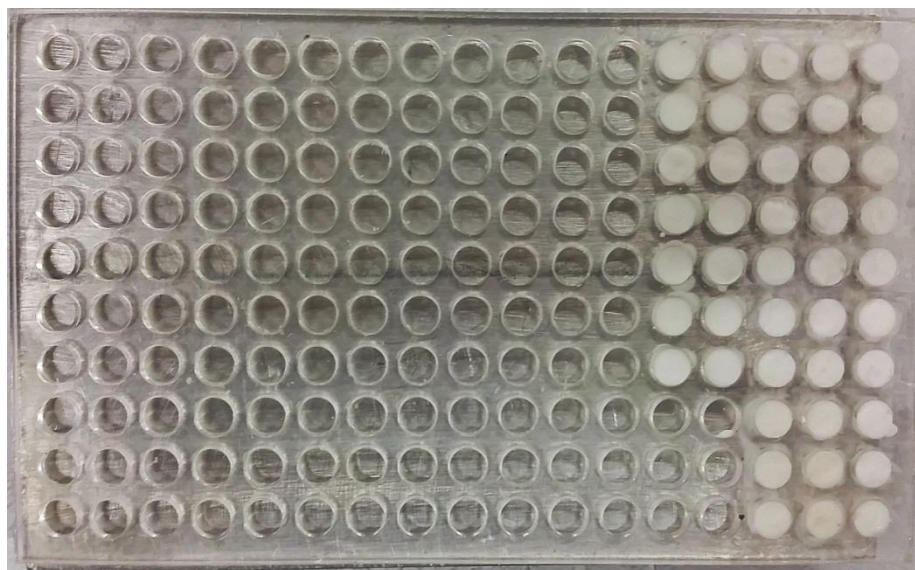


Fig. 3. Padrões em cera com excessos.

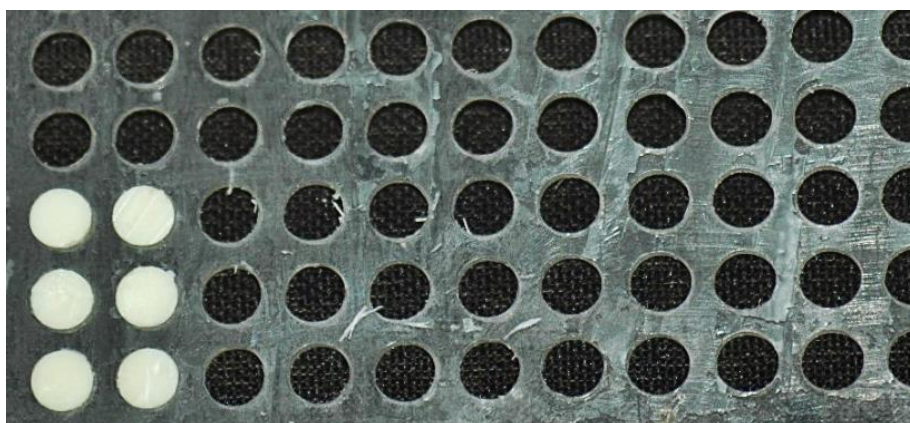


Fig. 4. Excessos removidos.

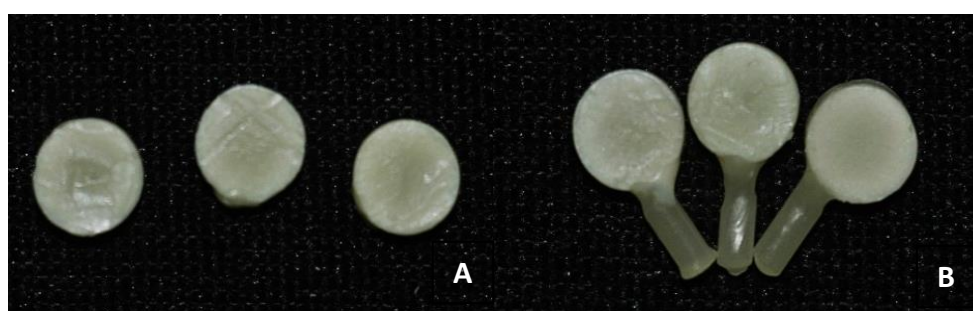


Fig. 5. (A) Padrões em cera prontos **(B)** Fixação dos *sprues* aos padrões em cera.



Fig. 6. Fixação dos padrões de cera na base do anel de fundição.

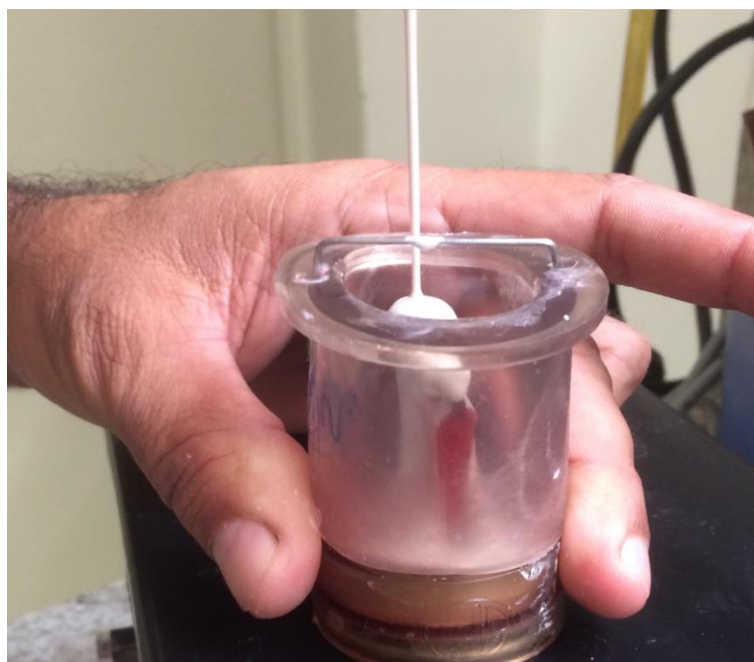


Fig. 7. Revestimento fosfatado sendo vertido no interior do anel.

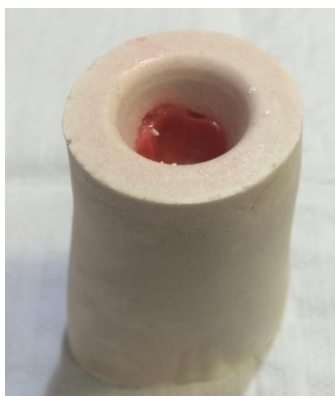


Fig. 8. Bloco de revestimento após sua presa.



Fig. 9. (A) Desinclusão e retirada dos padrões fundidos. **(B)** Amostras após recorte e jateamento com óxido de alumínio.

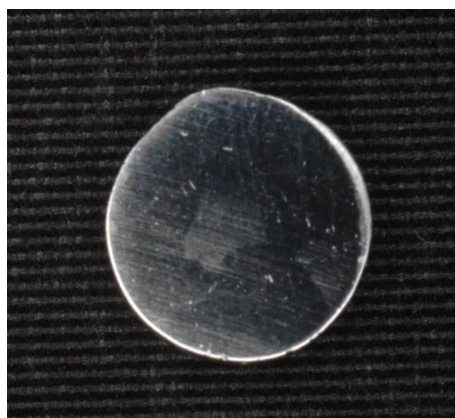


Fig. 10. Amostra de metal após polimento.

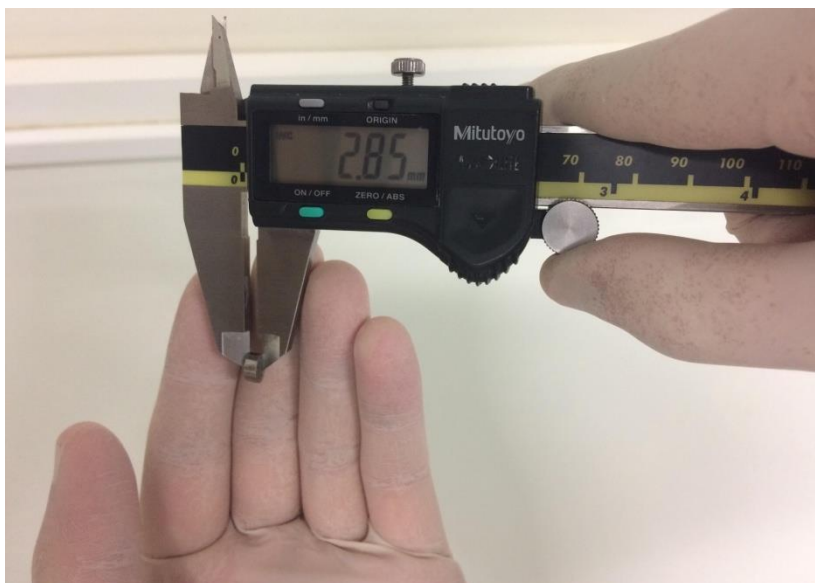


Fig. 11. Padronização da espessura das amostras.