



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

DERLY TESCARO NARCIZO DE OLIVEIRA

**RESINA PARA CONFEÇÃO DE APARELHOS
ORTODÔNTICOS: ANÁLISE DO EFEITO DE
SOLUÇÕES DESINFETANTES, CONVENCIONAIS
E EXTRATOS DE PLANTAS, SOBRE
PROPRIEDADES MECÂNICA E
MICROBIOLÓGICA**

São José do Rio Preto
2015

DERLY TESCARO NARCIZO DE OLIVEIRA

Resina para confecção de aparelhos ortodônticos: análise do efeito de soluções desinfetantes, convencionais e extratos de plantas, sobre propriedades mecânica e microbiológica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Tereza Gottardo de Almeida

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Antonio Bertoz

São José do Rio Preto
2015

Oliveira, Derly Tescaro Narcizo de

Resina para confecção de aparelhos ortodônticos: análise do efeito de soluções desinfetantes, convencionais e extratos de plantas, sobre propriedades mecânica e microbiológica/ Derly Tescaro Narcizo de Oliveira.

São José do Rio Preto, 2015.

57 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Margarete Tereza Gottardo de Almeida

1. Extratos Vegetais; 2. Resinas Acrílicas; 3. Biofilmes; 4. Ortodontia; 5. *Candida albicans*; 6. *Candida parapsilosis*.

Derly Tes caro Narcizo de Oliveira

Resina para confecção de aparelhos ortodônticos: análise do efeito de soluções desinfetantes, convencionais e extratos de plantas, sobre propriedades mecânica e microbiológica.

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa

Gottardo de Almeida

2º Examinador: Profa. Dra. Elsa Maria de Castilho

3º Examinador: Prof. Dr. Fernando Gongora Rubio

4º Examinador: Profa. Dra. Crislene Barbosa de Almeida

5º Examinador: Profa. Dra. Natália Martin

Suplentes: Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti e Profa. Dra. Mara

Corrêa Lelles Nogueira.

São José do Rio Preto, 02/10/2015

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Extratos de plantas.....	1
1.1.1 <i>Cymbopogon nardus</i> – Citronela.....	2
1.1.2 <i>Hydrastis canadensis</i> – Hidrastes.....	2
1.1.3 <i>Casearia sylvestris</i> – Guaçatonga.....	2
1.1.4 Gluconato de clorexidina.....	3
1.2 Resina acrílica.....	3
1.3 Biofilme.....	3
1.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	4
1.5 Teste de viabilidade celular.....	4
1.6 Ensaio mecânico para resistência flexural – 3 pontos.....	4
1.7 Desinfecção de resina acrílica.....	5
1.8 Objetivo.....	5
1.8.1 Objetivo geral.....	5
1.8.2 Objetivos específicos.....	5
2 RESULTADOS.....	9

2.1 Artigos Científicos.....	9
2.1.1. Artigo 1.....	10
2.1.2. Artigo 2.....	32
2.1.3 Artigo 3.....	40
3 CONCLUSÃO	51
4 REFERÊNCIAS	53

Dedicatória

Aos meus pais, **Recildo e Mercedes**, por seu amor incondicional e compreensão desmedida e por acreditar que eu seria capaz de alcançar minha meta e sonhos.

Ao meu irmão **Renê**, **minha cunhada Renata** e **meus sobrinhos Henrique e Heitor Recildo** por vocês serem especiais e a parceria de todos, sempre me oferecendo o melhor. Valeu “mano veio”, Cunhada querida e meus sobrinhos amados, razão do reavivar dos meus dias.

À minha irmã **Carolina**, que me proporcionou tantas alegrias nos momentos difíceis. Que gerenciou nossa clínica com propriedade enquanto estive ausente nesse momento que me dediquei ao curso de pós-graduação. Você, Léca, foi peça chave e indispensável, pois se você não existisse seria impossível a realização desse meu sonho. Amo-te e admiro-te.

Muito Obrigado, amada família!

Dedicatória

"O encontro de duas personalidades assemelha-se ao contato de duas substâncias químicas: se alguma reação ocorre, ambos sofrem uma transformação."

(Carl Gustav Jung)

À Professora **Margarete Teresa Gottardo de Almeida**, minha orientadora, obrigado pela incomensurável boa vontade que teve em todas as vezes que a procurei, por todo o carinho, compreensão e ensino, dedicado à minha pessoa desde nosso primeiro encontro no Laboratório de Microbiologia.

A senhora é muito especial!

Agradecimentos

A **Deus**, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho, me dar forças para seguir sempre em frente e renovar minhas esperanças a cada amanhecer.

Aos meus avôs paternos **Joaquim e Olívia** (em memória) pelas orações e por acompanharem meu crescimento como homem. Vó, saudades da senhora e dos seus bolinhos de chuva e chá de favação.

Aos meus avôs maternos, **Miguel e Matildes** (em memória) pelo tamanho zelo com minha vida. Meu querido avô, Mindó, que me inspirou a ser dentista e minha avó que me ensinou a amar a vida. Saudades de vocês.

A minha família querida, tios e tias, primos e primas pelo amor e incentivo em todos os momentos, mesmo separados pela distância.

Aos meus padrinhos e tios, **Wilson e Darcy**. Vocês sempre foram peças fundamentais na minha vida, pois sempre estiveram comigo em todas as datas importantes e isso os faz mais amados ainda.

A minha tia **Cely**, a sua lucidez é a sua maior aliada e foi assim que você me ajudou com tanto amor. Seu apoio e conversas longas sempre me nortearam e foram importantes nessa caminhada e as levarei comigo.

Ao **prof. Dr. Carlos Miguel Madeira**, que desde 1994 me acompanha e sempre me estimulou a ser mestre e agora doutor.

Ao Professor **Francisco Antonio Bertoz**, meu co-orientador e amigo que me deu a oportunidade de aprender muito, a quem imensamente agradeço pela sua co-orientação. Obrigado por me ensinar a ver a vida como ela é sem tirar nenhum detalhe aprendendo a encará-la, administrá-la e adorá-la.

A **Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto** – FAMERP, pelo crescimento científico e profissional.

Ao **prof. Dr. Fernando Ferrari** do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto e a **profa. Dra. Daniela Atili Brandini de Weert** da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba por toda a ajuda e colaboração nas análises estatísticas desse trabalho.

Ao **prof. Dr. Marcelo Coelho Goiato**, por ceder o espaço no Laboratório permitindo que o experimento mecânico desse trabalho se tornasse possível.

Aos queridos amigos e às queridas amigas de pós-graduação do laboratório de Microbiologia: **Natália, Luciani, Maisa, João Paulo (Zem), Eduardo, Larissa, Bianca, Lorena, Maicon e Thiago**, cujo apoio, incentivo e amizade foram fundamentais.

Aos queridos amigos de São José do Rio Preto **Kleber, Tiago e Harlen** por todo momento de descontração, ajuda e colaboração emocional para realização e apresentação deste trabalho.

Ao **Thales** que sempre me apoiou nos momentos em que a tecnologia foi requisitada. Sempre apareceu com suas opiniões pertinentes. Obrigado meu “quase” cunhado.

Agradecimentos

Ao casal querido de todas as horas, **Lilian e Fernando**. Amigos incondicionais. Mesmo de longe, lá de Dourados, sempre se fizeram presente. Lilian me ajudou na organização das ideias e emoções e o Fernando me inspirou artisticamente em cada passo dessa caminhada.

Aos meus alunos e minhas alunas dos cursos de pós-graduação em Ortodontia e da graduação em Odontologia da UNIRP e Unicastelo. Vocês sempre me inspiraram! Minha fonte da juventude.

Ao Coordenador do curso de pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, **professor Livre Docente Maurício Lacerda Nogueira**, pelo excelente exemplo na pesquisa científica e incentivo aos futuros profissionais.

Às professoras do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, profa. **Dra. Elza Maria Castilho**, profa. **Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira** e profa. **Ms. Cleuzenir Gomes Barbieri** obrigado pelos ensinamentos durante nossa caminhada no departamento.

Aos amigos **Prof. Dr. André Pinheiro de Magalhães Bertoz** e **prof. Dr. Renato Bigliuzzi** pelo apoio sincero e oportunidades de crescimento profissional.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias por todos os ensinamentos transmitidos. **Luceli, Emília e Mariela**, vocês fizeram a minha estadia durante o doutorado muito mais interessante. Com certeza ficarão eternizados na minha memória e guardados no meu coração.

Aos meus **pacientes**, que tiveram paciência e tolerância durante a minha ausência da clínica e sem os quais não seria possível realizar o doutorado.

Agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram, seja pelo companheirismo ou pelo simples fato de existirem e serem especiais.

**"A essência de toda arte bela,
De toda arte grandiosa,
É a GRATIDÃO."**

Allan Percy

Lista de Figuras

Artigo 1	11
Figura 1 - Photomicrograph of the surface of self-curing acrylic resin: A - negative control; B - positive control for <i>Candida albicans</i>	25
Figura 2 - Photomicrograph of the surface of self-curing acrylic resin: A - negative control; B - positive control for <i>Candida parapsilosis</i>	25
Figura 3 - Photomicrograph of the surface of self-curing acrylic resin: A - negative control; B - positive control for <i>Candida albicans</i> (3A) and <i>Candida parapsilosis</i> (3B) subjected to mechanical cleaning (brushing) .	26
Figura 4 - Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with <i>Candida albicans</i> and treated chemically by immersion in: A: <i>Cymbopogon nardus</i> , B: <i>Hydrastis canadensis</i> , C: chlorhexidine gluconate, D: <i>Casearia sylvestris</i>	26
Figura 5 - Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with <i>Candida parapsilosis</i> and treated chemically by immersion in: A: <i>Cymbopogon nardus</i> , B: <i>Hydrastis canadensis</i> , C: chlorhexidine gluconate, D: <i>Casearia sylvestris</i>	27
Figura 6 - Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with <i>Candida albicans</i> and treated mechanically by immersion in: A: <i>Cymbopogon nardus</i> , B: <i>Hydrastis canadensis</i> , C: chlorhexidine gluconate, D: <i>Casearia sylvestris</i>	28
Figura 7 - Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with <i>Candida parapsilosis</i> and treated mechanically by immersion in: A: <i>Cymbopogon nardus</i> , B: <i>Hydrastis canadensis</i> , C: chlorhexidine gluconate, D: <i>Casearia sylvestris</i>	29
Figura 8 - Percentage of inhibition of the <i>Candida albicans</i> and <i>Candida parapsilosis</i> biofilm after the mechanical treatment of acrylic resin	30
Figura 9 - Percentage of inhibition of the <i>Candida albicans</i> and <i>Candida parapsilosis</i> biofilm after the chemical treatment of acrylic resin	30
Figura 10 - Percentage of inhibition of the <i>Candida albicans</i> and <i>Candida parapsilosis</i> biofilm after the chemical and mechanical treatment of acrylic resin	31

Lista de Tabelas

Artigo 1		11
Tabel 1 -	Percentage of cell inhibition of <i>C. albicans</i> after all protocols	32
Tabel 2 -	Percentage of cell inhibition of <i>C. parapsilosis</i> after all protocols	32
Artigo 2		33
Tabela 1 -	Resultados de resistência flexural (MPa) dos corpos de prova tratados com os protocolos I, II e III.	40
Artigo 3		41
Tabel 1 -	Mean values (standard deviation) for testing flexural strength (MPa).	50
Tabel 2 -	Results of Analysis of Variance (ANOVA) two factors.	50
Tabel 3 -	Mean values (SDs) of the test flexural strength (MPa) for each disinfectant, regardless of the type of polymerization.	50

Lista de abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
<	Menor
®	Marca registrada
µm	Micrômetro
ADA	American Dental Association
cm	Centímetros
cm ³	centímetros cúbicos
cP	Centipoise
et al.	e outros
F	Força
g	Gramma
GI	Grau de liberdade
h	Hora
Ind. Com.	Indústria e Comércio Limitada
Ltda	
ISO	Organização Internacional de Normatização
min.	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MMA	Metilmetacrilato
MPa	Mega Pascoal
MS	Média
mS	Milistokes
n	Número de corpos de prova para um grupo
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
P	Significância estatística
PMMA	Polimetilmetacrilato
SDs	Desvio padrão
SS	Intervalo de significância
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
SEM	Scanning Eletronic Microscope
XTT	Teste de viabilidade celular
M	Grupo mecânico
MQ	Grupo mecânico e químico
Q	Grupo químico

Resumo

Introdução A evidência da associação entre doenças infecciosas em pacientes que utilizam aparelhos removíveis ortodônticos é fato observado como sendo a microbiota oral precursora de infecções, especialmente quando a higiene é deficiente. **Objetivo:** Avaliar o efeito, *in vitro*, de soluções desinfetantes de extratos de plantas e convencionais sobre, a resistência flexural dos corpos de provas confeccionados com resina acrílica ortodôntica quimicamente polimerizável, utilizando duas técnicas de polimerização e em diferentes protocolos de remoção do biofilme de *Cândida albicans* e *Cândida parapsilosis* da superfície de resina acrílica. **Material e Métodos:** Para o ensaio mecânico de resistência flexural, os corpos de prova (n=10) foram tratados com óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, extrato alcoólico de *Hydrastis canadensis*, extrato alcoólico de *Casearia sylvestris*, gluconato de clorexidina 2%, bicarbonato de sódio, pastilhas efervescentes, hipoclorito 1%. Definiu-se como o protocolo I: desinfecção mecânica por escovação da superfície com escovas com cerdas duras, durante um minuto, três vezes ao dia, durante 30 dias; ao protocolo II: desinfecção química, realizada com a ciclagem em 10 minutos de imersão, em 100 ml das soluções contempladas acima, três vezes ao dia, durante trinta dias; e, ao protocolo III: combinação dos protocolos I e II. Para o ensaio microbiológico, corpos de prova circulares (n=3), constituídos por biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram submetidos aos protocolos I, II e III. A estrutura celular e formação do biofilme foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e, a viabilidade celular, por método de redução de sais de tetrazolio (XTT). **Resultados:** À exceção do grupo sem tratamento (48h), os corpos de prova tratados com extratos de plantas e soluções convencionais reduziram os valores de resistência flexural, em comparação com o grupo controle, sem tratamento ($P < 0,05$). Entretanto, considerando-se apenas os grupos tratados entre si, as diferenças não foram estatisticamente significantes. Os valores de resistência à flexão mantiveram-se dentro dos padrões exigidos. No ensaio microbiológico, evidenciou-se a estruturação de biofilme maduro de *C. albicans* e *C. parapsilosis* e células individuais fixadas na superfície de resina, sendo os extratos de planta de maior ação inibitória, *Casearia sylvestris* e *Hydrastis canadensis*; *Cymbopogon nardus* e Gluconato de Clorexidina apresentaram os menores valores de ação antimicrobiana ($p < 0,05$). **Conclusão:** Extratos de *Casearia sylvestris*, *Hydrastis canadensis* podem ser indicados como compostos de ação antifúngica para desinfecção de aparelhos ortodônticos confeccionados com resina acrílica. As técnicas polimerização não interferem na resistência flexural de resina acrílica. Estudos futuros devem investigar a correlação dos tratamentos com extratos de plantas de ação sinérgica e propriedades das resinas acrílicas sobre biofilme maduro de *C. albicans* e *C. parapsilosis* e adesão celular e estruturação de biofilmes mono e polimicrobianos.

Palavras-chave: Extratos de plantas, Resinas, Biofilme, Ortodontia, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*

Abstract

Introduction: Evidence of an association between infectious diseases and removable orthodontic appliances is commonly observed with oral microbiota being a precursor of infections, especially when cleaning is deficient. **Objective:** To evaluate the *in vitro* effect of plant extract solutions and conventional disinfectant solutions on: the flexural strength of test pieces made of orthodontic chemically polymerized acrylic resin using two polymerization techniques and on different protocols to remove *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilm from the surface of acrylic resin. **Material and Methods:** The flexural strength of groups of ten test pieces was evaluated using mechanical testing after immersion in solutions of the essential oil of *Cymbopogon nardus*, alcoholic extract of *Hydrastis canadensis*, alcoholic extract of *Casearia sylvestris*, 2% chlorhexidine gluconate, sodium bicarbonate, effervescent tablets and 1% hypochlorite. Protocols were defined as: protocol I was mechanical brushing of the test piece surface with a stiff-bristled toothbrush for one minute, three times a day for 30 days; protocol II was chemical disinfection by 10 minutes of immersion in 100 mL of the aforementioned solutions, three times a day for thirty days and protocol III was a combination of procedures I and II. For the microbiological assay, circular test pieces (n = 3) with *C. albicans* and *C. parapsilosis* biofilm were subjected to Protocols I, II and III. Cell structure and biofilm formation were evaluated by scanning electron microscopy and cell viability was assessed using the tetrazolium salt reduction method (XTT). **Results:** The flexural strength was reduced of all the test pieces immersed for 48 hours in plant extract and conventional solutions compared to an untreated control group (p-value <0.05). However, there were no statistically significant differences between the treated groups and the flexural strength remained within the required range. There was no significant difference between the two polymerization techniques in respect to the flexural strength of acrylic resin. The microbiological assay identified mature biofilm structures of *C. albicans* and *C. parapsilosis* and individual cells fixed to the resin surface. Of the plant extracts, *Casearia sylvestris* and *Canadian hydrastis* had the greatest inhibitory action whereas *Cymbopogon nardus* and chlorhexidine gluconate had the least antimicrobial activity (p-value <0.05). **Conclusions:** Extracts of *Casearia sylvestris* and *Hydrastis canadensis* can be indicated as antifungal compounds for the disinfection of orthodontic appliances made of acrylic resin. Further studies should investigate the synergistic effect of treatment with plant extracts and properties of the acrylic resins on mature biofilm of *C. albicans* and *C. parapsilosis* and cell adhesion and the structure of monomicrobial and polymicrobial biofilms.

Keywords: Plant Extracts, Acrylic Resin, Biofilm, Disinfection, Orthodontics, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A evidência da associação entre doenças infecciosas em pacientes que utilizam aparelhos removíveis ortodônticos (AORs) é fato observado por cirurgiões dentistas.⁽¹⁾ A microbiota presente na cavidade oral, constituída por bactérias e fungos, é precursora as infecções, especialmente, quando a higienização é deficitária, e a sua ocorrência, em áreas retentivas de superfícies sólidas, mantém a estruturação de complexos microbianos como fator de risco adicional às doenças bucais.⁽²⁾

Destaca-se a presença da espécie *Candida albicans* como principal etiologia de candidose crônica atrófica, uma inflamação da mucosa, localizada sob os aparelhos acrílicos. De modo especial, tal ocorrência afeta dois terços da população usuária desses aparelhos, podendo trazer sérios prejuízos, como sangramento e dor, o que pode tornar inviável o seu uso.⁽³⁾

Outras espécies, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. stellatoidea* também podem ser isoladas de quadros de infecção.^(4,5) *C. parapsilosis* apresentam alta capacidade de aderir às superfícies inertes, e, conseqüentemente, no desenvolvimento de biofilme, padrão que dificulta a eliminação do micro-organismo por meios físico-químicos de tratamento.^(6,7)

A tendência natural dos micro-organismos em conviver em comunidade –biofilme- confere muitas vantagens, com destaque à maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e a ação de antimicrobianos, e como consequência, maior risco para o desenvolvimento de doenças.^(8,9)

1.1 Extratos de plantas

A biodiversidade vegetal é rica em princípios ativos que têm contribuído com o desenvolvimento de novos e efetivos medicamentos. As plantas constituem valiosa fonte de compostos bioativos,^(10,11) que por milhares de anos, vem sendo utilizados na medicina tradicional em todo o mundo.⁽¹²⁾ Além disso, ervas e especiarias, hoje, importante parte da dieta humana, são também conhecidas por suas propriedades antimicrobianas e anti-oxidantes, amplamente utilizadas em muitos países da Ásia e África.⁽¹²⁾

Estima-se que, cerca de 80% da população mundial faz uso de preparações de extratos de planta para atender às necessidades voltadas a saúde, levando-se em consideração seus efeitos benéficos anti-inflamatórios, antitumorais e antimicrobianos.⁽¹³⁾ Não obstante, na Odontologia estima-se que o uso de extrato de plantas pela população também vem se tornando mais comum.⁽¹⁴⁾

1.1.1 *Cymbopogon nardus* - Citronela

Cymbopogon nardus é uma gramínea perene cultivada no sudeste da Ásia. O óleo essencial desta erva é conhecido como óleo de citronela, e tem sido tradicionalmente utilizado como repelente de mosquitos, em produtos alimentares, sabonetes e cosméticos.⁽¹⁵⁾ O óleo essencial de citronela foi avaliado com evidente atividade antimicrobiana e antifúngica, embora os componentes ativos não tenham sido plenamente identificados.⁽¹⁶⁾

1.1.2 *Hydrastis canadensis* – Hidrastes

Hydrastis canadensis é uma planta nativa americana que tem um histórico de uso na medicina popular no tratamento de muitas doenças, como distúrbios gastrointestinais, alterações urinárias, hemorragias, doenças de pele, doenças de boca e infecções nos olhos.⁽¹⁷⁾ Nesta planta, um alcalóide denominado berberina foi identificado inicialmente com a função natural de promover a defesa das plantas contra a invasão de micro-organismos. Mediante este padrão fisiológico, estudos têm explorado a ação antimicrobiana responsável por outras associações clínicas contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e helmintos.^(17,18)

1.1.3 *Casearia sylvestris* - Guaçatonga

Casearia sylvestris é uma planta pertencente à família Flacourtiaceae, popularmente conhecida como “guaçatonga”, “erva-de-bugre” ou “cafezinho-do-mato”¹⁹, não cultivável, sendo obtida por processo de extrativismo¹⁹, com distribuição em muitos países.^(20,21)

Vários fitoquímicos foram descritos incluindo cumarinas, flavonóides e lignanas, alguns de atividade citotóxica em linhagens de células tumorais e anti-ulcerogênica.^(20,21)

As propriedades anti-inflamatórias, anti-úlcerações, anti-cancerígenas e antimicrobiana, foram previamente descritas.⁽²²⁾ Trabalhos que investiguem a afinidade da guaçatonga contra fungos são escassos, no entanto, estudos preliminares realizados em nosso laboratório revelaram efeitos antimicrobianos significativos e promissores.

1.1.4 Gluconato de Clorexidina

A clorexidina é um agente catiônico do grupo das biguanidas, que apresenta um amplo espectro antimicrobiano, sobre bactérias e fungos. Sua atividade sobre o metabolismo, crescimento e divisão celular surge por alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, além de precipitação de proteínas, alteração do balanço osmótico e/ou inibição da enzima ATPase.⁽²³⁾ Na prática odontológica, é indicado amplamente como método químico de controle de placa e prevenção da gengivite, bem como na desinfecção de superfícies inertes e acrílicas.⁽²⁴⁾

1.2 Resina Acrílica

A resina sintética mais utilizada na Odontologia é acrílica e constituída por poli (metilmetacrilato) – PMMA. Essa resina é comercializada na forma de pó e líquido. O pó é o metacrilato de metila, pré-polimerizado, na forma de partículas esféricas muito pequenas, contendo pigmentos corantes e o iniciador ativo, peróxido de benzoíla. O líquido é o monômero de metacrilato de metila, com adição de um inibidor da polimerização (hidroquinona). Quando se misturam o pó e o líquido, surge uma massa plástica, que pode ser moldada à forma desejável, cuja é acompanhada de aquecimento.^(25,26)

1.3 Biofilme

À semelhança de outros micro-organismos presentes na cavidade bucal, algumas espécies do gênero *Candida* possuem a habilidade da adesão às resinas acrílicas dos AORs, direta ou indiretamente.⁽²⁷⁾

Em contraste a vasta descrição dos biofilmes bacterianos, pouca atenção tem sido prestada, do ponto de vista clínico, especialmente aos biofilmes formados por fungos. Na odontologia, devido às respostas inflamatórias que podem ocorrer nas mucosas bucais, decorrente do contato com as superfícies acrílicas, o biofilme tem sido alvo do interesse de diversos estudos.^(28,29)

Segundo Donlan e Costerton (2002), as células formam micro colônias, e estão irreversivelmente aderidas a uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo completamente alterado, no que diz respeito à taxa de crescimento e metabolismo microbianos.⁽³⁰⁾ Sobre esta condição que se estruturam complexos celulares maiores, com variedade e contendo altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos.^(31,32)

1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é o método de escolha para análise dos biofilmes, quanto à estrutura, pois permite uma resolução com imagens de alta ampliação (até 300.000 vezes).⁽³³⁾ Além disso, possibilita a análise minuciosa dos efeitos causados pelas soluções desinfetantes sobre microrganismos em biofilmes, como remoção destes da superfície do material e alteração na sua morfologia.⁽³⁴⁾ Em contra partida, a microscopia eletrônica é limitada para estudos de características funcionais de microrganismos, como a viabilidade celular, seja em células planctônicas, ou em biofilme.⁽³⁵⁾ Conforme as imagens de MEV são geradas, observa-se uma aparência tridimensional característica, útil para avaliar a superfície de uma dada amostra.⁽³⁶⁾

1.5 Teste de viabilidade celular XTT

Os sais de Tetrazólio são reduzidos pela ação metabólica das células em derivados de formazam, cuja ação pode ser observada por avaliação espectrofotométrica.⁽³⁷⁾

Em 1963, Slater et al.⁽³⁸⁾ reportou a primeira vez que os sais de tetrazólio (XTT) foram reduzidos pela via respiratória mitocondrial. Em 2014, Doke⁽³⁹⁾ utiliza esta atividade para medir proliferação e sobrevivência celular. Este teste apresenta a vantagem de obter um valor negativo que o permite permanecer solúveis após a redução, permitindo o estágio de solubilização do formazam.⁽⁴⁰⁾

1.6 Ensaio mecânico para resistência flexural - 3 pontos

A resistência é a tensão máxima necessária para causar fratura ou a deformação plástica de um material. Diferentes métodos podem ser utilizados para avaliar a resistência dos materiais, sendo o mais comum, o ensaio de resistência à flexão indicativo da propriedade mecânica.^(41,42)

Neste ensaio, os corpos de prova são levados à uma Máquina de Ensaio Universal, calibrada em velocidade de cinco milímetros por segundo, para realização do teste mecânico de acordo com as normas da ADA. Um suporte metálico contendo dois pontos de sustentação é utilizado, sendo aplicada força axial e equidistante aos dois outros pontos, até a ruptura do corpo de prova.

1.7 Desinfecção de resina acrílica

Existem várias maneiras de se fazer a desinfecção de superfície de resina acrílica, segundo orientação odontológica: o tratamento mecânico, feito com escova dental e a desinfecção química com aspensão ou imersão em solução desinfetante.^(43, 44)

A escovação da superfície dos AOR é considerada como um dos métodos de desinfecção mais efetivos para a prática diária na limpeza de AOR⁴⁸. Neste sentido, a superfície deve receber o tratamento mecânico utilizando-se escovas de cerdas duras e sem o uso de dentifrícios. Estes produtos têm na composição abrasivos, que danificam a superfície do AOR, diminuindo assim, o seu tempo de uso clínico.^(45,46)

A imersão de AOR se mostra eficaz na eliminação dos micro-organismos da boca e, aos presentes na superfície dos AORs, portanto é segura para o paciente. Adicionalmente, é recomendado o descarte da solução desinfetante

após o seu uso no protocolo químico por imersão dos AORs, evento que impossibilita a contaminação da solução.

As soluções mais indicadas para a desinfecção de resina acrílica para AORs são: gluconato de clorexidina, pastilhas efervescentes, bicarbonato de sódio e hipoclorito de sódio.⁽⁴⁷⁾

Estudos para idealizar a solução mais eficaz na limpeza dos AORs tem levantado a ideia de ampliar para os extratos de plantas em busca de uma solução que tenha efeito antimicrobiano, mantenha as características físicas, químicas e mecânicas da resina acrílica utilizada para a confecção de AORs e não interferir na saúde do paciente.

Considerando-se a rotina clínica odontológica, observa-se que pacientes portadores de aparelhos ortodônticos removíveis estão expostos a um risco maior para doenças orais. Neste sentido, é relevante a busca de terapêuticas alternativas complementares, mais econômicas e factíveis. O rigor no controle de infecções bucais causadas por fungo é de fundamental importância para saúde bucal, e como consequência, para redução dos riscos das doenças sistêmicas.

1.8 OBJETIVO

1.8.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste estudo foram avaliar, *in vitro*:

O efeito dos protocolos de desinfecção I, II e III, sobre resistência flexural de resina acrílica quimicamente ativada (AORs);

A ação antimicrobiana das soluções de extratos de plantas e gluconato de clorexidina, sobre biofilme, constituído em superfície de resinas (protocolos II e III).

O efeito de duas técnicas de polimerização sobre a resistência flexural de resina acrílica quimicamente polimerizável, após o tratamento químico por imersão (protocolo II) com gluconato de clorexidina 2%, bicarbonato de sódio, pastilhas efervescentes e hipoclorito de sódio 1%.

1.8.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram avaliar, *in vitro*, os protocolos I, II e III, nas condições abaixo descritas:

Protocolo I: desinfecção mecânica por escovação da superfície com escovas com cerdas duras, durante um minuto, três vezes ao dia, durante 30 dias; Protocolo II: desinfecção química, realizada com a ciclagem em 10 minutos de imersão, em 100 ml das soluções desinfetantes, três vezes ao dia, durante trinta dias; e, Protocolo III: combinação dos protocolos I e II.

A eficácia do Protocolo I de ação mecânica, com escovas de cerdas duras na remoção de biofilme de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, da superfície de resina acrílica;

A eficácia do Protocolo II de ação química de extratos de plantas: óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, extrato alcoólico de *Hydrastis canadensis*, extrato alcoólico de *Casearia sylvestris* e gluconato de clorexidina na remoção de biofilme de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* da superfície de resina acrílica;

A eficácia do Protocolo III na remoção de biofilme *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* da superfície de resina acrílica;

O efeito das soluções de extratos de plantas: óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, extrato alcoólico de *Hydrastis canadenses*, *Casearia sylvestris* e soluções convencionais (gluconato de clorexidina 2%, bicarbonato de sódio e hipoclorito de sódio 1%), sobre a resistência flexural de resina acrílica;

Analisar e comparar duas técnicas de polimerização diante da resistência flexural.

A hipótese nula testada foi que não haveria diferenças diante dos protocolos propostos, entre duas técnicas de polimerização, sobre a ação antimicrobiana e a resistência flexural, com extratos de plantas e soluções convencionais para higienização e desinfecção das superfícies de resina acrílica para AORs.

2 RESULTADOS

2. RESULTADOS

2.1. Artigos Científicos

Os resultados deste trabalho encontram-se descritos em artigos submetidos e para submissão à publicação em revistas indexadas.

Artigos:

1. **Derly Tescaro Narcizo de Oliveira**, Francisco Antonio Bertoz, Aimée Maria Guiotti, Luciane Gaspar de Toledo, Natalia Seron Brizzoti e Margarete Teresa Gottardo de Almeida. **Conventional solution and plant extracts: Evaluation of the efficacy of disinfection protocols of acrylic resin in orthodontics in respect to *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.** (submetido: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics em 12/10/2015).

2. **Derly Tescaro Narcizo de Oliveira**, Aimée Maria Guiotti, Luciane Gaspar de Toledo, Natalia Seron Brizzoti e Margarete Teresa Gottardo de Almeida **Análise do efeito de soluções desinfetantes convencionais e extratos de plantas sobre propriedade mecânica de resina acrílica de aparelhos ortodônticos** (a ser submetido).

3. **Derly Tescaro Narcizo de Oliveira**, Margarete Teresa Gottardo de Almeida, Maria Cristina Rosifini Alves Rezendes, André Pinheiro de Magalhães Bertoz, Renato Bigliuzzi, Francisco Antonio Bertoz. **Effect of polymerization techniques and cleaning solution on flexural resistance of acrylic resin chemically activated** (aceito: de Oliveira, Derly Tescaro Narciso, et al. Effect of polymerization techniques and cleaning solution on flexural resistance of acrylic resin chemically activated. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene* 2015 fev;7:3(28-32.).

2.1.1. Artigo 1.

Conventional solution and plant extracts: Evaluation of the efficacy of disinfection protocols of acrylic resin in orthodontics in respect to *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.

Derly Tescaro Narcizo de Oliveira¹

Francisco Antonio Bertoz²

Aimée Maria Guiotti³

Luciani Gaspar de Toledo⁴

Natália Seron Brizzotti⁵

Margarete Teresa Gottardo de Almeida⁶

1- MSc, Postgraduate Student, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Medicine School in São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

2- DDS, MSc, PhD, Professor and Chair, Department of Orthodontics, Dentistry School of Araçatuba – UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil.

3- DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Dental Materials and Prosthesis, Dentistry School of Araçatuba – UNESP- Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil.

4- Postgraduate Student, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Medicine School in São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

5- Postgraduate Student, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Medicine School in São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

6- DDS, MSc, PhD, Professor and Chair, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Medicine School in São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: MSc Derly Tescaro Narcizo de Oliveira, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitária, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto– FAMERP - Av. Brigadeiro Faria Lima, - 5416 - Vila São Pedro CEP: 15090-000 - São José do Rio Preto – SP Phone: +55-17- 3201-5700 - e-mail: derlytno@hotmail.com

Abstract

Introduction: Evidence of an association between infectious diseases and removable orthodontic appliances is commonly observed with oral microbiota being a precursor of infections, especially when cleaning is deficient. **Methods:** Circular acrylic test pieces were contaminated with *C. albicans* or *C. parapsilosis* and let the biofilm formation for 48h. Both groups of test pieces were submitted to three disinfection protocols: mechanical using one minute of brushing, chemical by immersion for 10 minutes in different solutions (chlorhexidine gluconate, *C. nardus*, *C. sylvestris*, *H. canadensis*) and a combination of both procedures. Analysis of the antimicrobial action on the biofilm was measured by the cell viability XTT; and scanning electron microscope for evaluation on the surface of the acrylic resin. **Results:** Denoted statistically significant difference considering the combined mechanical and chemical protocols were more efficacious than isolated protocols. All three protocols reduced the viability of the *C. albicans* and *C. parapsilosis* in biofilm. The *C. sylvestris* and *H. canadensis* solutions were more effective in removing microbial and inhibiting the cell viability of *C. albicans* and *C. parapsilosis* in biofilm than *C. nardus* and chlorhexidine gluconate. The results from quantification assays were compared using two-way ANOVAs with Tukey post-hoc tests ($p < .05$). **Conclusion:** Combined mechanical and chemical disinfection procedures with plant extracts should be the routine in the dental clinical practice. Clinical studies that have investigated the safety and efficacy of such plant-derived medicines, especially *C. sylvestris* and *H. canadensis* will also be described.

Keywords: Plant Extracts, Acrylic Resin, Biofilm, Disinfection, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*

Introduction

Evidence of an association between infectious diseases and the use of removable orthodontic appliances (ROAs) is commonly observed by dentists¹. The chemical composition of the resins used for making ROAs today is considered very important; methyl methacrylate is the preferred material as it has an inert surface even though it favors microbial adherence. This microbiota is a precursor of infections, especially when cleaning is deficient².

Microorganisms of the genus *Candida* are present in the oral cavity in about 50% of the human population although they do not generally cause disease³. However, under certain circumstances, they can act as an

infectious agent evolving to chronic atrophic candidiasis, an inflammation of the oral mucosa, with the main etiologic agent being *Candida albicans*. In fact, infections affect two-thirds of the population that uses ROAs, in some cases causing serious harm, such as bleeding and pain, making the continued use of the appliance impossible³. Furthermore, an emergent species, *Candida parapsilosis*, is the leading cause of candidiasis in some centers^{4,5}. The main virulence characteristic of *C. parapsilosis* is associated with its capacity to adhere to inert surfaces, and hence, the development of biofilm^{6,7}. Biofilm is composed of a set of microorganisms that live together, forming a multicellular community, both on tissues and on prostheses, catheters and other surfaces^{8,9}. As a benefit, these communities are better protected against the host's immune defenses and the action of antimicrobial agents^{7,10}.

As a lack of hygiene is the key event in the formation of biofilm and the emergence of commonly associated diseases, several products and corresponding disinfection protocols have been developed¹¹. With widespread use in all areas of health, chlorhexidine gluconate solution is used to disinfect surfaces and is an important oral mouthwash because of its high antimicrobial power. Recent studies have shown chlorhexidine to be effective to disinfect facial, dental, and ocular prostheses and orthodontic appliances^{9,12}.

Plant biodiversity is rich in active ingredients that have contributed to the development of many effective drugs^{13,14} which, for thousands of years, have been used around the world in traditional medicine¹⁵. In fact, some plant extracts that have antioxidant and antimicrobial properties are still widely used in many countries of Asia and Africa. It is estimated that about 80% of the world population uses herbal preparations to meet their health needs¹⁶.

Because of the situation of diseases that affect the oral cavity of patients with ROAs, there is a need for the development of cheaper, alternative or complementary therapies with easy access for the population,

and new options to counteract the resistance of microorganisms against current therapies.

Thus, considering the binomial - microorganism and the surface of resins used to make ROAs - it is important to understand disinfection and related variables.

Furthermore, the aim of this study was to evaluate and compare *in vitro* the efficacy of three protocols to remove biofilm of *C. albicans* and *C. parapsilosis* from the surface of acrylic resin used to manufacture ROAs: mechanical action, chemical action and combined, mechanical and chemical actions.

The null hypothesis to be tested is that there are no differences between the conventional protocols used to clean and disinfect the surfaces of acrylic resin for orthodontic appliances and the alternative protocols proposed in this study.

Materials and Methods

For this study 110 test pieces were made of self-curing clear acrylic, mixed according to the manufacturer's instructions (Jet®, Classic, Dental Products, São Paulo, SP) using a 5-mm circular mold. Polymerization was achieved under 40 psi pressure in dry conditions for five minutes in a semiautomatic electric pressure pan (Metal Vander®, Piracicaba, SP). After making, all the test pieces, they were sterilized using ethylene oxide and bagged.

Equal numbers of test pieces were contaminated by two fungal species kept at the Laboratory of Microbiology of the Medicine School in São José do Rio Preto: *C. albicans* - ATCC 90028 and *C. parapsilosis* - ATCC 22019. The inoculum and the formation of the biofilm were prepared following the technique described by Yoshijima et al.¹⁷.

Disinfection protocols

1) Mechanical action: brushing

The sterility of the toothbrushes was initially evaluated by plating using a Sabouraud Dextrose Agar culture medium (DIFCO®). Mechanical cleaning of test pieces contaminated with fungi was performed by brushing the surface

with a back-and-forth movement for one 1 min using twenty toothbrushes (Personal Extra Clean, Colgate – Palmolive Company®, São Bernardo do Campo, SP).

2) Chemical action: immersion

For this protocol, contaminated test pieces were placed into a microplate and immersed in the four solutions for 10 minutes: 2% chlorhexidine gluconate (Farmácia Manipulare Ltd, São José do Rio Preto, SP), alcoholic tincture of *Hydrastis canadensis* (Schraibmann Homeopatia, Laboratório Schraibmann LTDA, Carapicuíba, SP), alcoholic tincture of *Casearia sylvestris* (Flores e Ervas Qualidade Farmacêutica, São Francisco do Sul, SC) and essential oil of *Cymbopogon nardus* (Pharmaspecial Espec. Quim. e Farm. Ltd, São Paulo, SP).

3) Combined action (mechanical and chemical): brushing and immersion

Contaminated test pieces were first cleaned by brushing as in the mechanical action protocol and then immersed in the four different solutions as in the chemical action protocol described above.

All evaluations were performed in triplicate. In all three protocols, an assessment of the biofilm structure and cell viability was made shortly after cleaning using scanning electron microscopy (SEM) (Topcon Scanning Electron Microscope Model SM-300) according to the technique described by Seneviratne et al.¹⁸ and tetrazolium salts reduction (XTT) as described by Pitangui et al.¹⁹. The photomicrographs were obtained by standard microscopic analysis of five regions of the acrylic surface of the test pieces: central, upper left, upper right, lower right and lower left fields. The cell viability of the *C. albicans* and *C. parapsilosis* biofilms was measured after the reduction assay using a Labtech LT 4000 ELISA reader with microtitration as a percentage reduction of cell viability based on absorbance values (optical density: 492 nm) of the study samples and the positive and negative controls.

Results

All toothbrushes were found to be sterile before initial tests.

Table 1 and 2 present the mean and standard deviation the results of the cell viability values for the protocols I, II and III, against *C. albicans* and *C. parapsilosis* biofilms. These first analyses showed statistically significant differences among the protocols in relation to control.

After an independent analysis of the different protocols of treatment in isolation, except control, significant differences were found, for *Hydrastis canadensis*, considered the best solution of antimicrobial activity, followed by the *Cymbopogon nardus* and *Casearia sylvestris*. Differently, Chlorhexidine gluconate was the solution with the lowest antimicrobial effect (Tukey test $p < .05$ and ANOVA test $p < .001$).

The positive and negative controls were analyzed by SEM (Figures 1 and 2). The electron microscopy images show irregularities with microbial adhesion on the acrylic resin surfaces of the positive control test pieces and absence of microorganisms for the negative control.

Figure 3 shows that the mechanical action of brushing with a toothbrush removed all the *C. albicans* and *C. parapsilosis* cells from the acrylic resin surface. Furthermore, after friction due to the action of the bristles or perhaps the polymerization of the material, the resin surface had structural irregularities.

None of the four solutions was totally effective in removing *C. albicans* from the surface of the acrylic resin after immersing the test pieces for 10 minutes (Figure 4). However, *H. canadensis* (Figure 4B) and *C. sylvestris* (Figure 4D) removed larger percentages of the microorganism than *C. nardus* (Figure 4A) and chlorhexidine gluconate (Figure 4C).

Although treated with *Cymbopogon nardus*, Figure 4A shows an extensive area of resin colonized by individual or planktonic cells in the biofilm of *C. albicans*. Note that this plant extract did not remove the cells on the surface of the resin. Moreover, in Figure 4C, the *C. albicans* cells appear in pseudofilaments even after immersion in chlorhexidine gluconate. Again, this compound was ineffective to remove colonies of the microorganism on the surface of acrylic resin.

All four solutions disinfected the test pieces contaminated by *C. parapsilosis* biofilm to a certain extent (Figure 5).

On immersion in plant extracts or chemical compounds, in particular the *C. nardus* solution, the surface of the test pieces became rougher compared to the negative control (Figures 1, 2, 4 & 5).

C. albicans and *C. parapsilosis* were removed from the surface of the resins by disinfection using both mechanical and chemical actions (Figures 6 and 7). Moreover, the surface of the test pieces disinfected using *H. canadensis* (Figure 6B) and *C. sylvestris* solutions (Figure 6D) had no irregularities unlike those cleaned using *C. nardus* (6A) and chlorhexidine gluconate (6C).

The effect of the combined mechanical and chemical actions of brushing and subsequent immersion in solutions on the surface of the resin is demonstrated in Figures 6 and 7. Note the irregularities of the acrylic resin surface treated with *C. nardus* in Figures 6A and 7A.

Cell viability of the *C. parapsilosis* and *C. albicans* biofilms was measured after XTT reduction using the optical density value compared to a standard and reported as a percentage reduction (Figures 8-10). The mean absorbance values (OD 492 nm) of the positive and negative control groups were 2.36 and 1.10 for *C. albicans* and 1.18 and 1.10 for *C. parapsilosis*, respectively. There were reductions of cell viability in the biofilm for all the disinfection protocols, especially for the plant extracts and chlorhexidine gluconate; the latter is considered the gold standard in dentistry.

The results obtained by brushing the test pieces (mechanical action) showed that *C. parapsilosis* adhered to the acrylic resin surface more than *C. albicans*. The mechanical protocol was more effective in the disinfection of *C. albicans* and the chemical protocol of *C. parapsilosis*.

Independent of the fungal species, the disinfection was the highest for the *H. canadensis* solution and the lowest for *C. nardus*. Similar levels of disinfection were observed for the *C. sylvestris* and chlorhexidine gluconate solutions. *C. parapsilosis* was the most sensitive of the two species in respect to chemical treatment (Figure 9).

Except for *C. nardus* in respect to *C. parapsilosis*, the combination of mechanical and chemical action had the best disinfection action as shown by

the high percentage of cell death (Figure 10). Again, *H. canadensis* was the solution that most reduced the viability of cells compared to the other products.

On comparing protocols (chemical and combined), the combined mechanical and chemical disinfection was significantly better than chemical disinfection alone except in relation to disinfection using *C. nardus* against *C. parapsilosis*. Once again *H. canadensis* proved to be a better disinfectant than the other protocols. Chlorhexidine gluconate does not provide significant inhibitory action against *C. parapsilosis* compared to the combined mechanical and chemical action, a situation that did not occur with other disinfection protocols.

Discussion

The oral cavity hosts a variety of microorganisms, most of which are established opportunistic pathogens²⁰. Knowledge about oral microbiota and its relation to oral disease has been widely studied especially in users of removable orthodontic appliances. The presence of an oral appliance increases the already favorable conditions for microbial colonization, which, in turn, may induce the appearance of lesions in dental enamel and gum inflammation²¹.

One hygiene strategy which of brushing of teeth, aims to minimize the risks of leaving microorganisms on the surface of resin and other components of the appliance²². Proof of the sterility of brushes when new, as in the current study, reinforces the concept that the oral microbiota is the main source of mouth disease.

The results of this study support the hypothesis that brushing is the main mechanical and prophylactic means of cleaning the teeth²³ as the biofilm produced by *C. albicans* and *C. parapsilosis* was removed from the acrylic resin surface with brushing. According to Bacchi et al.²⁴, to make orthodontic patients clearly understand the importance of mechanical cleaning and to motivate them to give due attention to this care, is no easy, but necessary, task. Self-regulation of mechanical cleaning with the removal

of microorganisms on the acrylic resin surface of braces by the patient may prevent oral infections as was shown by this study.

Acrylic resins are made from polymethyl methacrylate (PMMA) powder and the methyl methacrylate monomer (MMA); this is currently the commonest method of making removable orthodontic appliances²⁵ due to its low cost, aesthetics and easy handling²⁶⁻²⁸. Although the manufacturing instructions include strict control of temperature, time and handling, polymerization results in surface variations inherent to the material^{29,30}. In the present study, the irregularity of the resin surface, observed by SEM in the negative and positive control groups, demonstrates the possibility of microbial adhesion and retention, thereby favoring the colonization.

The disinfectant solutions used in this study were chosen due to their properties described in the literature^{31,32} as well as to results of a pilot project, in which *H. canadensis*, *C. sylvestris*, *C. nardus* and chlorhexidine gluconate showed excellent cleansing activity against fungi. In this study, the time of contact of the chemical compound with the resin was insufficient to completely remove *C. albicans*; however, there were differences between the solutions with better results for *H. canadensis* and *C. sylvestris*. The presence of intact individual blastospores and pseudofilaments adhered to the surface shows that the solutions were not totally effective in the given time (ten minutes).

Immersion in the chemical solutions changed the surface of all the test pieces; however, the changes were significantly greater for those disinfected using the essential oil of *C. nardus*. During the essential oil extraction process from leaves, fewer wax compounds are extracted³³, and so there is less protection of this oil on contact with the resin surface.

In the current study, *C. nardus* extract had little activity against the *C. albicans* biofilm as blastoconidia were seen by SEM on the resin surface even after the chemical action, thus disagreeing with a study published by Davi et al.³⁴. However, the current study confirmed the activity of this extract on *C. parapsilosis* biofilm, indicating the existence of species-specific biological mechanisms of susceptibility to different products.

Surface roughness is a feature dependent on the existence of micro porosity^{35,36}. In this study surface roughness was more intense after treatment by *H. canadensis* and *C. sylvestris* (alcohol extraction). The variations observed in the present study may be due to the absorption of the chemicals into the pores with a subsequent chemical reaction resulting in surface changes. Because of the negative impact of chlorhexidine gluconate on the surface of acrylic resin, its use in disinfection protocols should be questioned and studied further.

The reduction in the viability of the biofilm in the current investigation shows that *H. canadensis* may be an alternative to treat diseases caused by *C. albicans* and *C. parapsilosis*, given the antifungal activity. Although no phytochemical has been investigated, this event could be related to berberine, demonstrated by other studies^{37,38}.

Interestingly, the antimicrobial action of chlorhexidine gluconate, as reported by other studies in dentistry^{39,40}, was not so effective in this study against *C. albicans* and *C. parapsilosis*; this compound is considered the gold standard.

The exposure time of 10 minutes was insufficient to completely disinfect the test pieces, as was seen by the presence of cells in pseudofilaments. However, greater antimicrobial activity may be achieved by extending the time of immersion, but this would certainly cause further physical changes to the resin surface which may compromise the quality of the appliance.

Chemical reactions related to dietary habits that promote biofilm and other events related to the resin surface, occur in the oral cavity. Current research shows the results obtained from *in vitro* assays and so further clinical studies are needed to confirm the issues described herein.

It seems rational that these compounds should be investigated as possible new products against antimicrobial resistance and recurrent infections associated with *C. albicans* and *C. parapsilosis* biofilm.

Disinfection methods combining mechanical and chemical actions were slightly better than the individual protocols.

The laboratory disinfection and storage procedures were not exactly the same as other study protocols as few investigations consider the acrylic resin specific to orthodontic appliances. Furthermore, although there is a wide diversity of disinfection protocols, those with plant extracts are rare, and none use the extracts investigated in the current study.

Conclusions

Extracts of *H. canadensis*, *C. sylvestris* and *C. nardus* have potential antifungal actions.

Solutions of *C. sylvestris* and *H. canadensis* are more effective than *C. nardus* and chlorhexidine gluconate in removing *C. parapsilosis* and *C. albicans* biofilm from the surface of acrylic resin demonstrating that these are potential antifungal agents.

In general, the association of mechanical and chemical protocols is more efficient in disinfection against fungi than the protocols in isolation.

Further studies should investigate the active compounds and antimicrobial action and to evaluate their synergistic or antagonistic actions with other compounds.

Tests for toxicity and genotoxicity are necessary prior to the use of these compounds in the clinical practice.

References

- 1- Lessa FCR, Ito CE, Yoko I, Faria G, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances Am J Orthod Dentofacial Orthop 2007;131:705.e11-705.e17.
- 2- Srivastava B, Bhatia HP, Chaudhary V, Aggarwal A, Singh AK, Gupta N. Comparative evaluation of oral *Candida albicans* carriage in children with and without dental caries: a microbiological *in vivo* study Int J Clin Pediatr Dent. 2012 May-Aug; 5(2): 108–112.
- 3- Pachava KR, Nadendla LK, Alluri LS, Tahseen H, Sajja NP. Invitro antifungal evaluation of denture soft liner incorporated with tea tree oil: a new therapeutic approach towards denture stomatitis. J Clin Diagn Res. 2015 Jun;9(6).
- 4- Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida spp.* Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect. v. 50, p. 243, 2002.

- 5- Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, v. 154, p. 63, 2002.
- 6- Merseguel KB et al. "Genetic Diversity of Medically Important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infectious Diseases* 2015 15; 57.
- 7- Douglas JL. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol*, v. 11, p. 30, 2004.
- 8- Soll DR. *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? *Current Biology*, v. 18, p. 717, 2008.
- 9- Busscher HJ, Geertsema-Doornbusch GI, van der Mei HC. Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: Influence of salivary conditioning films *J of Biomedical Materials Research*, 1997: 34:201–210.
- 10-Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*. 2013;59(4):251-264.
- 11-Moura CDVS, Nogueira LBLV, Valente VS, Oliveira JC, Bezerra AA, Rodrigues ACS Precisão dimensional de moldes de hidrocloreto irreversível manipulado com solução de clorexidina *RFO* 2013 maio/ago. 18(2); 165-169.
- 12-Ciesielski FIN, Biasoli ER, Goiato MC, Carli JP, Silva SO, Linden MSS, Trentin MS; Miyahara GI. Biofilmes orais como um possível fator de risco ao câncer bucal *Odonto* 2010;18(36):127-138.
- 13-Khan R, Zakir M, et al. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal strains, *J. Infect. Dev. Ctries* v. 4, p. 292, 2010.
- 14-Runyoro DKB, Ngassapa OD, Matee MIN, Joseph CC, Moshi MJ. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of *Candida* infections, *J. Ethnopharmacology*, v. 106, p. 158, 2006.
- 15-Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali M, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin, *Molecules*, 2008.
- 16-Singh G, Kapoor IPS, Singh P, Heluani CS, Lampasona MP, Catalan CAN. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 3295, 2008.

- 17-Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, Miyake Y. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses* **53**, 221–226, 2010.
- 18-Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics* 8: 2936–2947 2008.
- 19-Pitangui, NS et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. *Biofouling*. v. 28, n. 7, p. 711–718, Aug 2012.
- 20-Sreenivasan PK, Mattai J, Nabi N, Xu T, Gaffar A. *Oral Microbiol Immunol* 2004, 19, 297.
- 21-Auchill TM, Hein M, Hellwing E, Scullean A, Arweiler NB. *J Clin Periodontol* 2005, 90, 1015.
- 22-Suga SS, Pinto-Guedes AC, Simonato MRL. Avaliação in vitro da influência do polimento superficial de resina acrílica para aparelhos ortodônticos na adesão e remoção de *Streptococcus mutans* R Dental Press Ortodon Ortop Facial 94 Maringá, v. 10, n. 1, p. 94-107, jan./fev. 2005.
- 23-Garcia FCP. Evaluation of the roughness and mass loss of the flowable composites after simulated toothbrushing abrasion. *Pesqui Odontol Bras, São Paulo*, v. 18, n. 2, p. 156-161, Apr. 2004.
- 24-Pinto TMS, Neves ACC, Leão MVP, Jorge AOC. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida spp.* in complete denture wearers. *J. Appl. Oral Sci.* 2008; 16(6): 835-890.
- 25-Rantala LI, Lastumäki TM, Peltomäki T, Vallitu PK. Fatigue resistance of removable orthodontic appliance reinforced with glass fibre weave. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 30, p. 501-506, 2003.
- 26-Straioto FG, Ricomini Filho AP, Fernandes Neto AJ, Del Bel Cury AA. Polytetrafluorethylene added to acrylic resins: mechanical properties. *Brazilian Dental Journal*, v. 21-1, p. 55-59, Mar. 2010.
- 27-Jagger DC, Harrison A, Al-Marzoug K. Effect of the addition of Poly (methyl methacrylate) beads on some properties of acrylic resin, v. 13(5), p. 378-382, 2000.
- 28-Shimizu H, Mori N, Takahashi Y. Use of metal conditioner on reinforcement wires to improve denture repair strengths. *New York State Dental Journal*, v. 74, p. 26-28, mar. 2008.

- 29-Retamoso LG. Influência do método de manipulação na topografia de superfície da resina acrílica autopolimerizável RGO, Porto Alegre, v. 57, n.3, p. 335-338, jul./set. 2009.
- 30-Gonçalves TS, Spohr AM, Souza RM, Menezes LMM. Surface roughness of auto polymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. *The Angle Orthodontist*: September 2008, Vol. 78, No. 5, pp. 931-934.
- 31-Faltermeier A, Rosentritt M, Mussing D. *Am J Orthid Dentofacial Orthop*, 2007, 131, 301.
- 32-Souza RF, Regis RR, Nascimento C, Paranhos HFO, Souza RF, Silva-Lavorato CH. Domestic use of a disclosing solution for denture hygiene: a randomised trial. *Gerodontology*, 2010, 27, 193.
- 33-Cavallari MM, Gimenes MA, Billot C et al. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. *Annals of Botany*. 2010;106(4):627-636.
- 34-Davi LR, Peracini A, Soares RB, Silva CH, Paranhos HF. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology*, 2010 Dec;27(4):297-302.
- 35-Souza RF, Freitas OPH, Lovato SCH, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009, 4;CD007395.
- 36-American Dental Association. Specifications n° 12 for denture base polymers. Councils on dental materials and devices, reports of councils and bureaus. *J Am Dent Assoc* 1975; 90, 39.
- 37-Meyer B., 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeter. Biodegr.* 51, 249–253.
- 38-Park KS, Kang KC, Kim KY, Jeong PY, Kim JH, Adams DJ, et al. HWY-289, a novel semi-synthetic protoberberine derivative with multiple target sites in *Candida albicans*. *J AntimicrobChemother* 2001;47:513–9.
- 39-Chibinski ACR, Grando K, Patrícia Fanchin T, Campagnoli E, Santos FA, Wambier DS. Descontaminação de escovas dentais utilizadas por crianças portadoras de necessidades especiais: análise microbiológica RSBO 2011 jun 8; 2.
- 40-Miessi AC, Goiato MC, Ribeiro PP, SANTOS DM, Pesqueira AA, Haddad MF Avaliação da microdureza superficial de quatro diferentes resinas acrílicas para base de dentaduras *Cienc Odontol Bras* 2007 out./dez.; 10 (4): 49-54.

Figure Legends:

Figure Captions:

Fig. 1. Photomicrograph of the surface of self-curing acrylic resin: A - negative control; B - positive control for *Candida albicans*

Fig. 2. Photomicrograph of the surface of self-curing acrylic resin: A - negative control; B - positive control for *Candida parapsilosis*

Fig. 3 Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with *Candida albicans* (3A) and *Candida parapsilosis* (3B) subjected to mechanical cleaning (brushing)

Fig. 4 Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with *Candida albicans* and treated chemically by immersion in: A: *Cymbopogon nardus*, B: *Hydrastis canadensis*, C: chlorhexidine gluconate, D: *Casearia sylvestris*

Fig. 5 Photomicrographs of the surface of self-curing acrylic resin contaminated with *Candida parapsilosis* and treated chemically by immersion in: A: *Cymbopogon nardus*, B: *Hydrastis canadensis*, C: chlorhexidine gluconate, D: *Casearia sylvestris*

Fig. 6 Photomicrograph of the surface of self-curing resin contaminated with *Candida albicans* and disinfected mechanically by brushing and chemically by immersion in: A: *Cymbopogon nardus*, B: *Hydrastis canadensis*, C: chlorhexidine gluconate, D: *Casearia sylvestris*

Fig. 7 Photomicrographs of the surface of self-curing resin contaminated with *Candida parapsilosis* and disinfected mechanically by brushing and chemically by immersion in: A: *Cymbopogon nardus*, B: *Hydrastis canadensis*, C: chlorhexidine gluconate, D: *Casearia sylvestris*

Fig. 8 Percentage of inhibition of the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilm after the mechanical treatment of acrylic resin

Fig. 9 Percentage of inhibition of the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilm after chemical treatment of acrylic resin

Fig. 10 Percentage of inhibition of the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* after chemical and mechanical treatment of acrylic resin

Figures

Fig.1

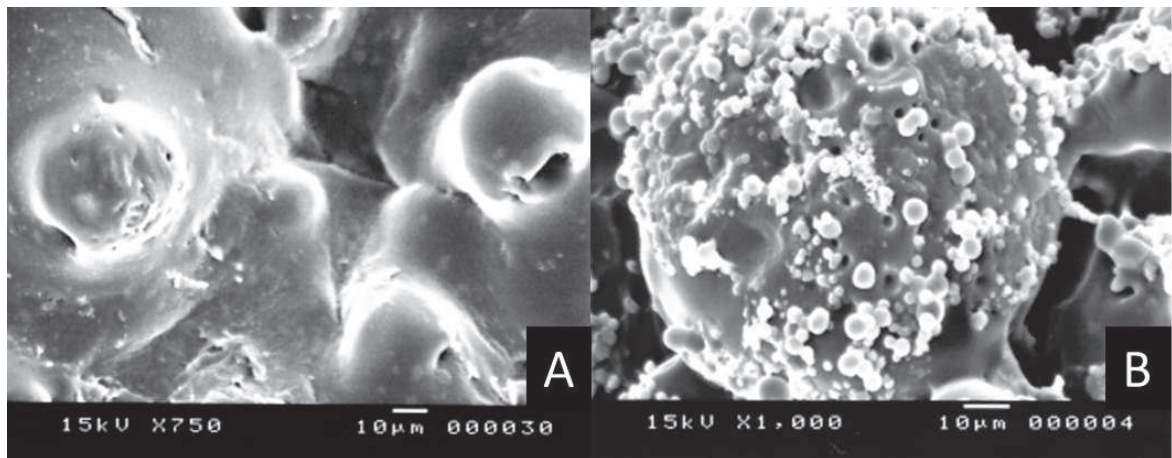


Fig. 2

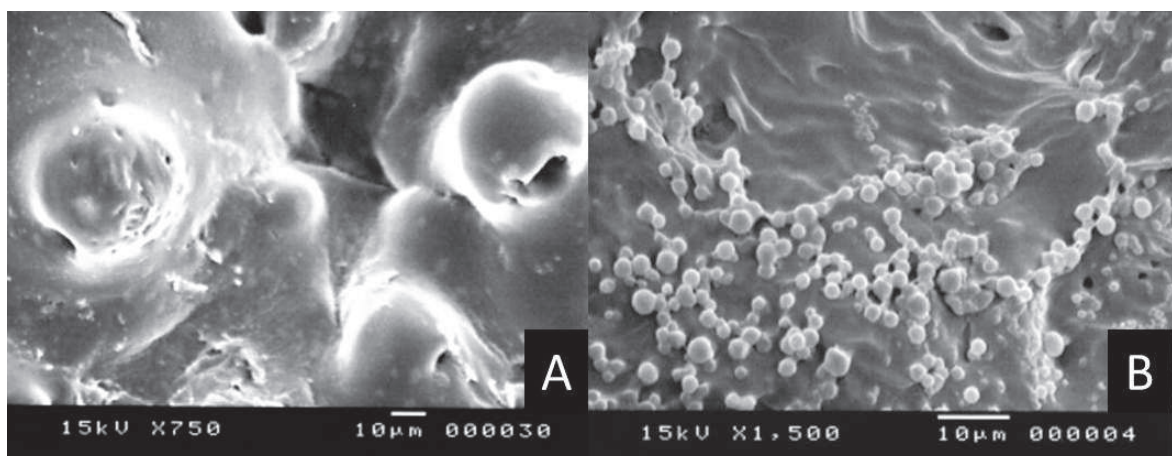


Fig. 3

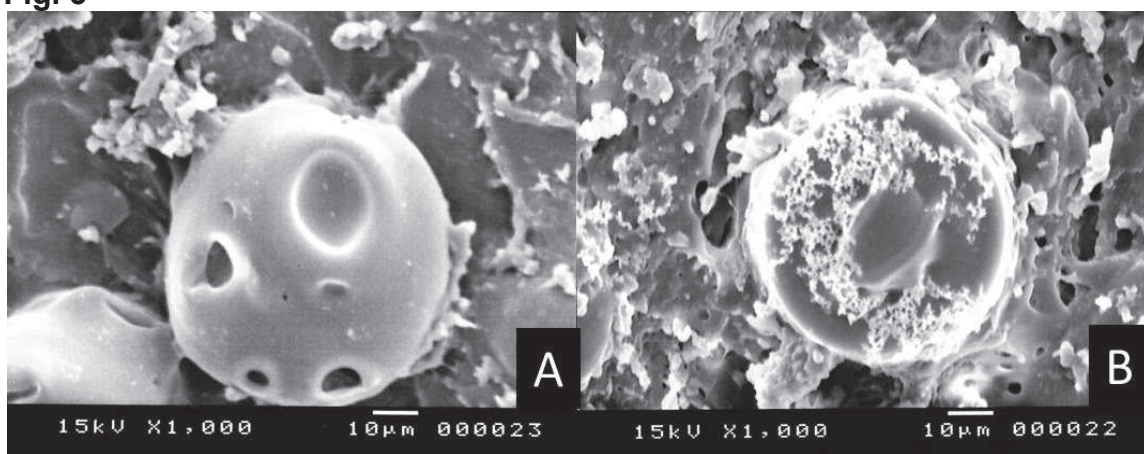


Fig.4

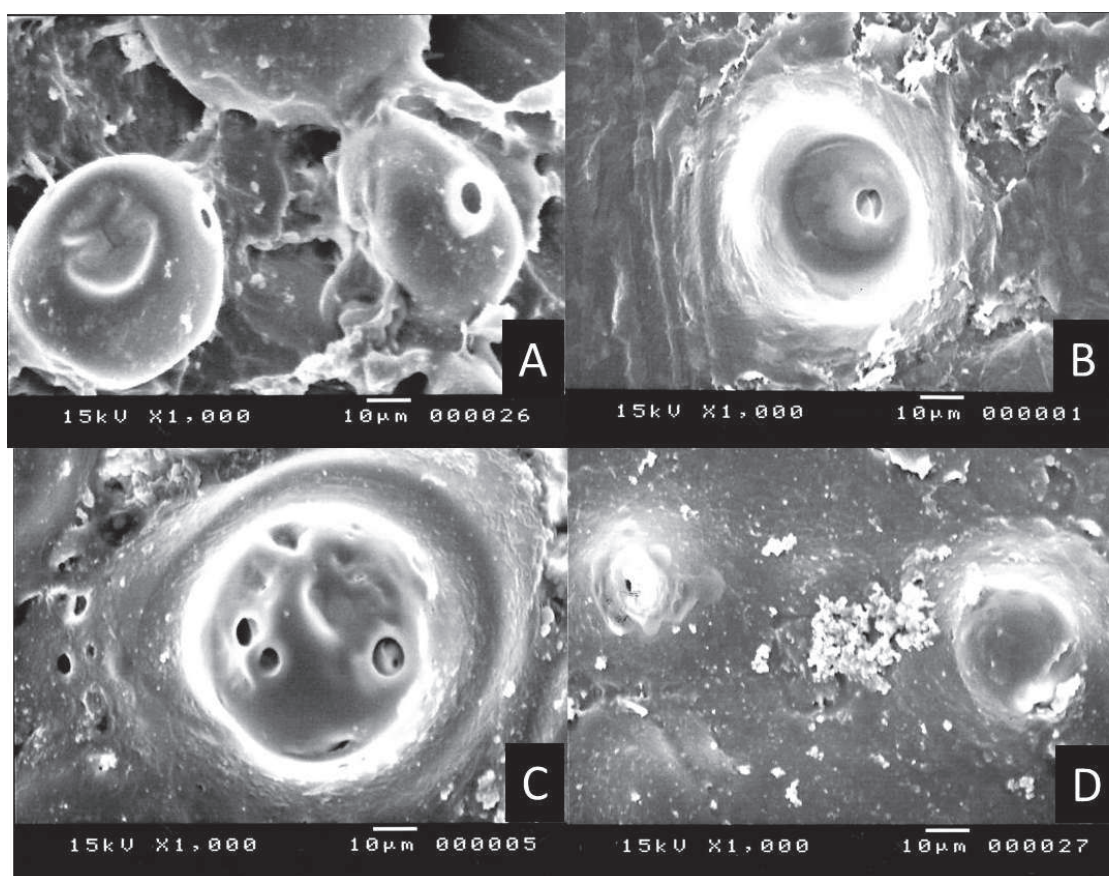


Fig.5

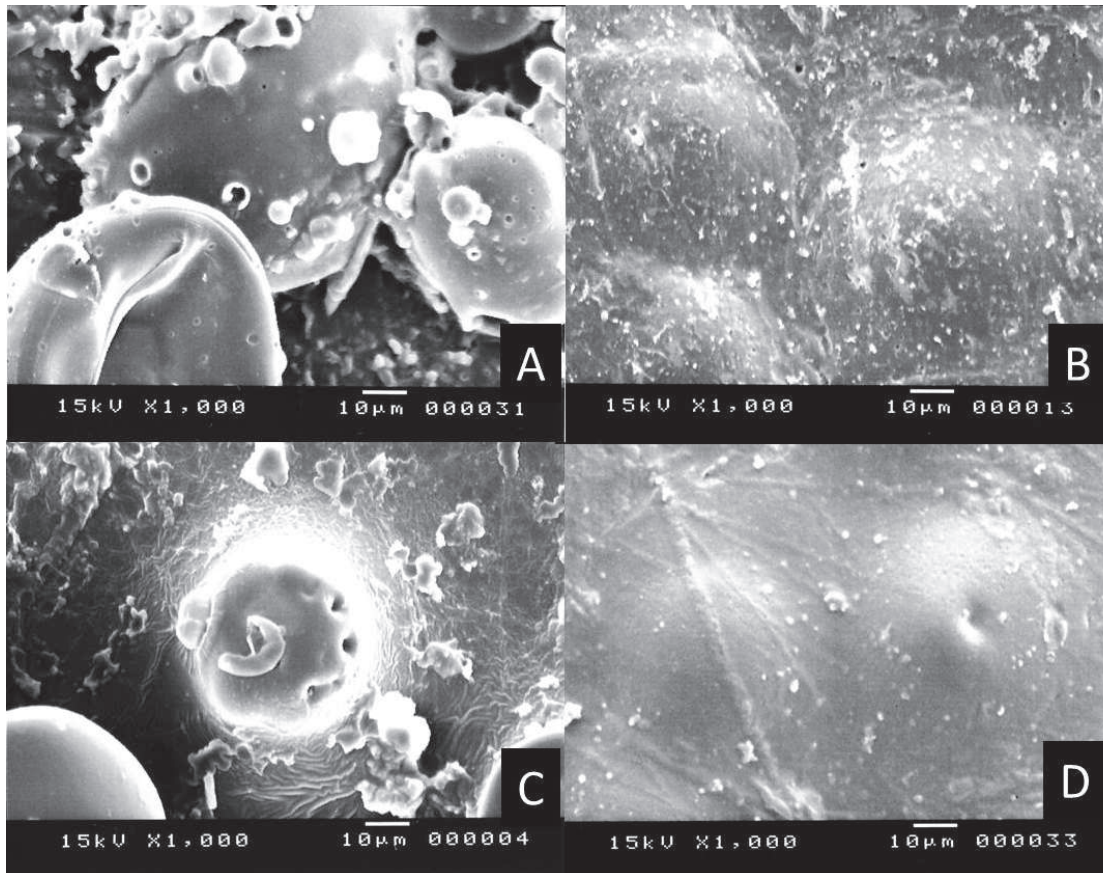


Fig.6

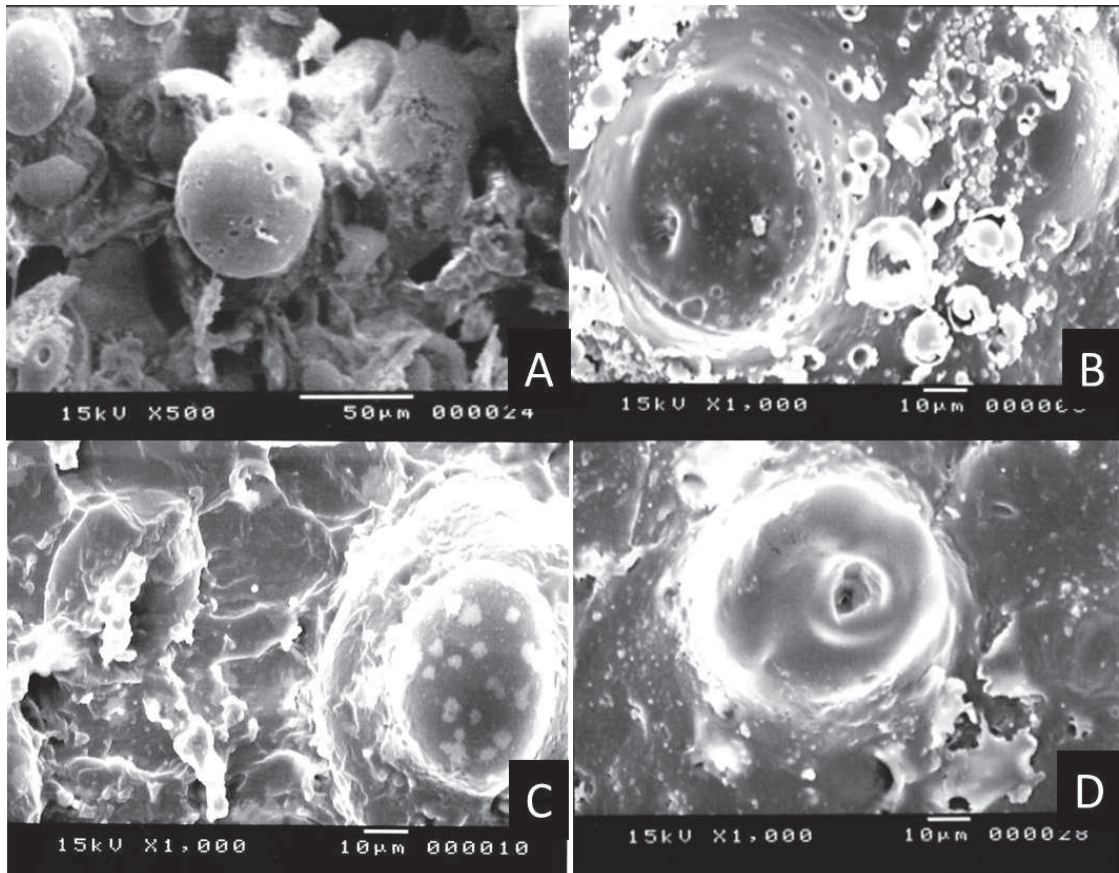


Fig.7

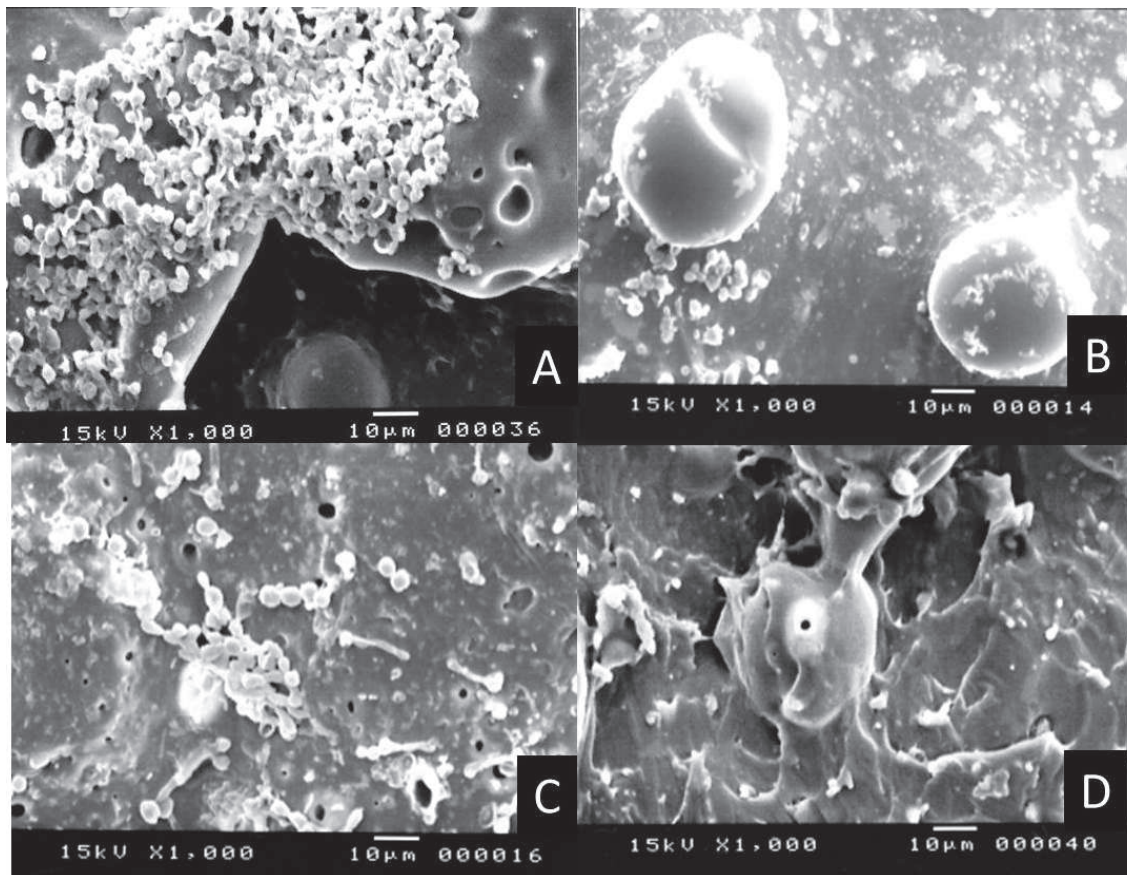


Fig. 8

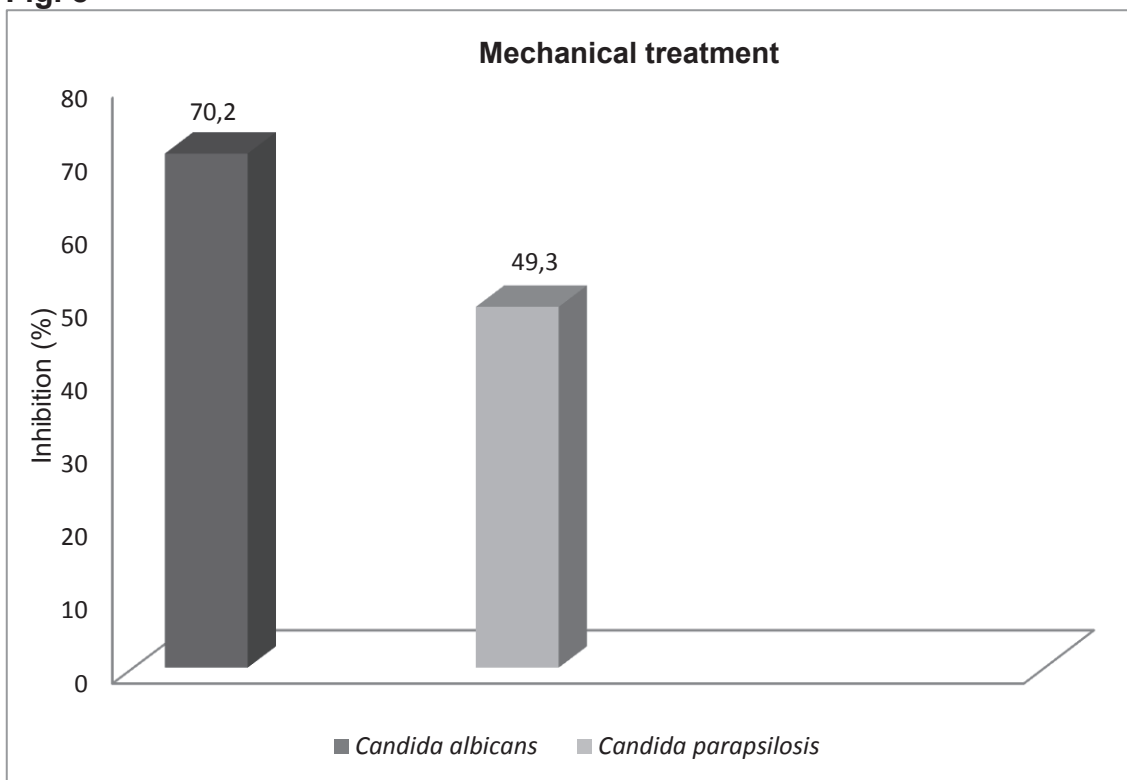


Fig. 9

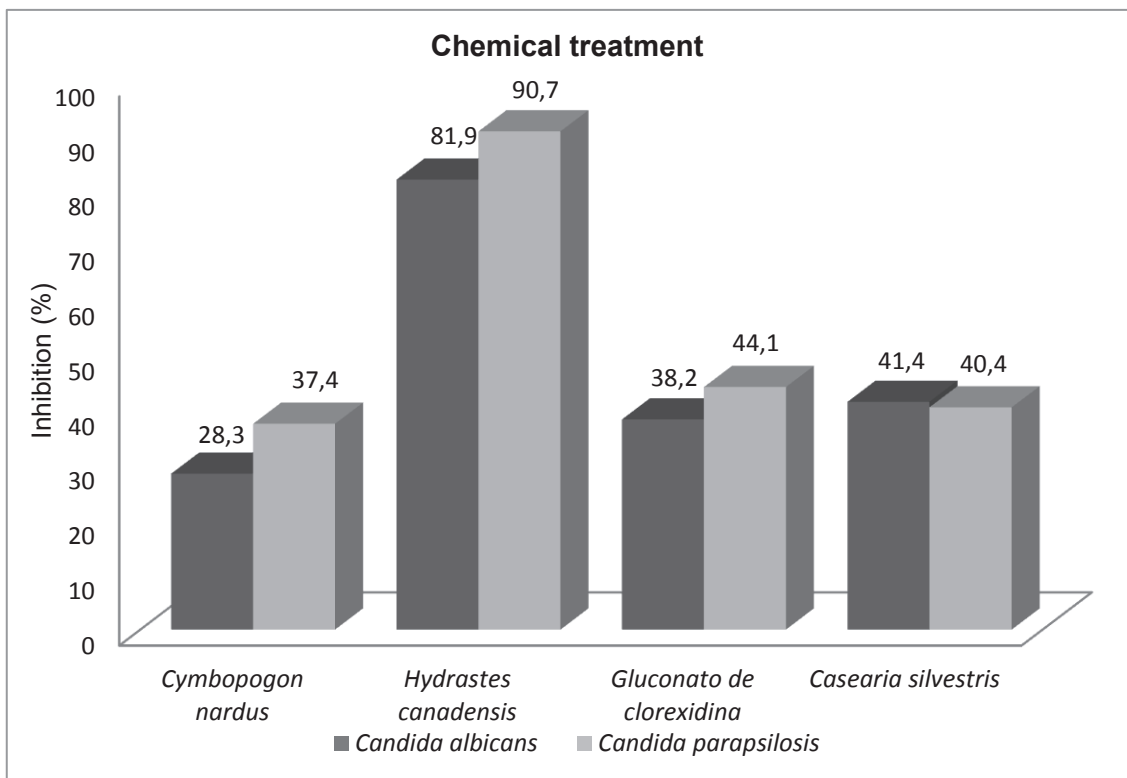


Fig.10

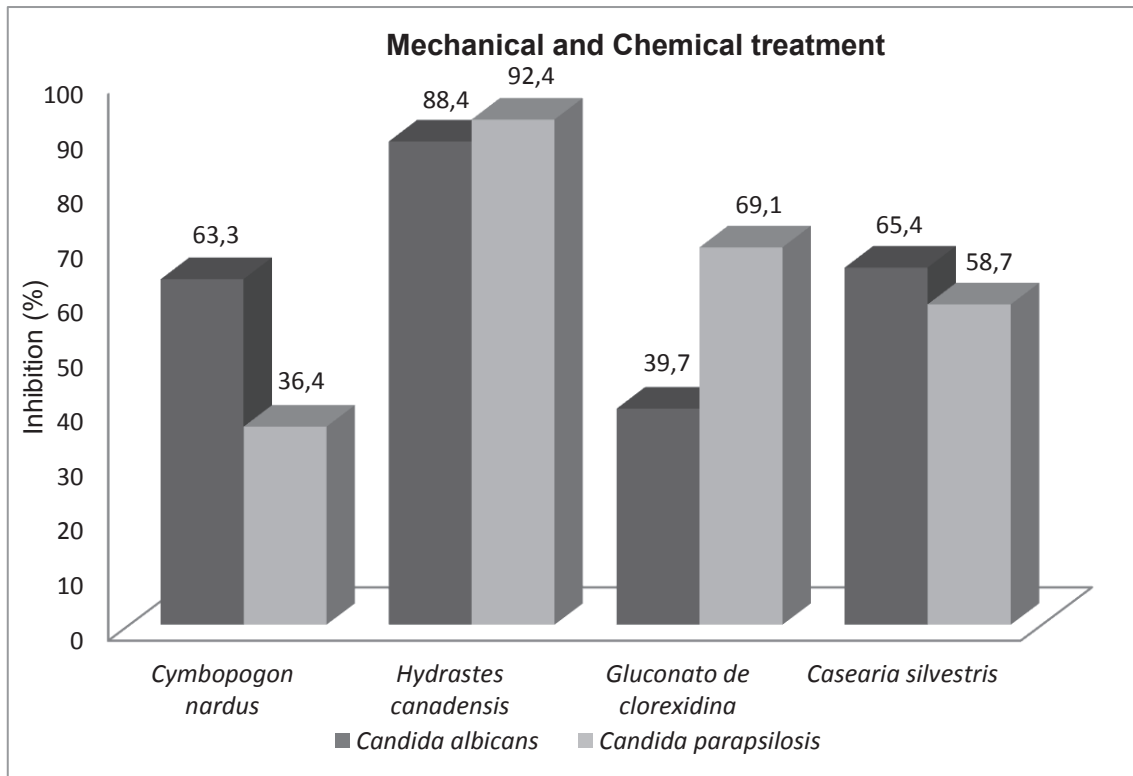


Table title:

Table 1 Percentage of cell inhibition of *C. albicans* after all protocols

Tukey post-hoc tests * $P < .05$ denotes statistically significant difference. *gl*: degrees of freedom; SS: Sum of Squares; MS: Mean Square.

Percentage of cell death of the <i>Candida albicans</i> after the hygiene protocols on the acrylic resin						
Porcentagem						
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Mecânico	3	70,5100A	,43000	,24826	69,4418	71,5782
Q_CN	3	28,6767B	2,72221	1,57167	21,9143	35,4390
Q_HC	3	81,9500C	1,43503	,82851	78,3852	85,5148
Q_GC	3	37,8633D	,32021	,18487	37,0679	38,6588
Q_CS	3	42,2733E	1,86790	1,07843	37,6332	46,9134
MQ_CN	3	63,0600F	,60324	,34828	61,5615	64,5585
MQ_HC	3	88,1567G	,36556	,21106	87,2486	89,0648
MQ_GC	3	39,6267E	2,29666	1,32598	33,9215	45,3319
MQ_CS	3	65,2100H	,51391	,29670	63,9334	66,4866
Total	27	57,4807I	20,31803	3,91021	49,4432	65,5183

Table 2 Percentage of cell inhibition of *C. parapsilosis* after all protocols

Tukey post-hoc tests * $P < .05$ denotes statistically significant difference. *gl*: degrees of freedom; SS: Sum of Squares; MS: Mean Square.

Percentage of cell death of the <i>Candida parapsilosis</i> after the hygiene protocols on the acrylic resin						
Porcentagem						
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Mecânico	3	49,4733A	1,04500	,60333	46,8774	52,0693
Q_CN	3	37,5033B	,28006	,16169	36,8076	38,1990
Q_HC	3	90,0533C	,14844	,08570	89,6846	90,4221
Q_GC	3	44,1000D	1,30334	,75248	40,8623	47,3377
Q_CS	3	41,6000D	,29206	,16862	40,8745	42,3255
MQ_CN	3	36,3567B	,28290	,16333	35,6539	37,0594
MQ_HC	3	92,7100C	,34117	,19698	91,8625	93,5575
MQ_GC	3	69,0767E	,28449	,16425	68,3700	69,7834
MQ_CS	3	58,4933F	2,44238	1,41011	52,4261	64,5605
Total	27	57,7074	20,89516	4,02128	49,4416	65,9733

2.1.2. Artigo 2.

Análise do efeito de soluções desinfetantes convencionais e extratos de plantas sobre resistência flexural de resina acrílica de aparelhos ortodônticos

Introdução

A evidência da associação entre doenças infecciosas em pacientes que utilizam aparelho ortodôntico removível confeccionados com resina acrílica, material amplamente utilizado na Odontologia,⁽¹⁾ é fato observado por cirurgiões dentistas. A microbiota presente é precursora das infecções, especialmente, quando a higienização é deficitária, e a sua presença, em áreas retentivas de superfícies sólidas, mantém substratos que favorecem esse evento.^(2,3)

Os micro-organismos presentes na cavidade bucal colonizam a resina acrílica, e os aparelhos assim constituídos, podem se tornar nichos de aderência, levando a sérios danos aos tecidos bucais.⁽⁴⁾

Os micro-organismos do gênero *Candida* estão presentes na cavidade oral de cerca de 50% da população humana e, geralmente não causam doenças³. *C. albicans*, entretanto, em determinadas circunstâncias, pode atuar como agente infeccioso, nos quadros de candidose crônica atrófica, especialmente em pacientes que utilizam aparelhos acrílicos. Estes relatam queixas principais: sangramento, prurido, vermelhidão e dor, o torna inviável o seu uso.⁽⁴⁾

A esterilização/desinfecção por métodos físicos, como a autoclavagem, de aparelhos ortodônticos removíveis é inviável, pois o ponto de ebulição do monômero que compõe a resina acrílica é de 103,3 °C e a temperatura de distorção térmica é relativamente baixa (95°C). Desta forma, a utilização de desinfecção química se faz necessária.^(5,6) Para essa desinfecção, diversos agentes químicos podem ser utilizados.^(7,8,9)

A biodiversidade vegetal é rica em princípios ativos que têm contribuído com o desenvolvimento de novos e efetivos medicamentos. *Cymbopogon nardus*, *Hidrastis canadensis*, *Casearia sylvestris* são uma valiosa fonte de compostos bioativos,^(10,11) e vêm sendo utilizados na medicina tradicional.^(12,13)

A busca de alternativas terapêuticas ou complementares, mais econômicas e de fácil acesso populacional, é necessária. As doenças que acometem a cavidade bucal e, os diversos quadros bucais, visualizados nos pacientes portadores de aparelhos ortodônticos removíveis necessitam ser avaliados, frente aos protocolos de tratamento e prevenção.

Assim, considerando-se o binômio – micro-organismo presentes na boca e materiais utilizados para confecção de aparelhos ortodônticos removíveis - é relevante compreender diferentes processos de desinfecção, e as variáveis que os envolvem.

Os objetivos deste estudo foram avaliar e comparar, *in vitro*, a eficácia dos protocolos da ação mecânica, química (imersão em soluções) e da associação mecânica/química sobre a resistência flexural dos corpos de prova confeccionados com resina acrílica quimicamente polimerizável.

A hipótese nula a ser testada é que não há diferenças, sobre a resistência flexural, entre os protocolos propostos para higienização e desinfecção das dos corpos de prova confeccionados com resina acrílica para aparelhos ortodônticos, frente aos métodos mecânicos, químicos ou a associação de ambos.

Materiais e Métodos

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo, Brasil; e Departamento de Prótese e Materiais Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, São Paulo, Brasil.

Para este trabalho, 110 corpos de prova foram confeccionados com acrílico autopolimerizável, incolores, manipulados de acordo com as normas do fabricante (JET®, Clássico, Produtos Odontológicos, São Paulo, SP) utilizando-se matriz metálica retangular, conforme a especificação número 12 das normas da Academia Americana de Odontologia (A.D.A). Para teste de resistência flexural, seguindo-se da técnica de polimerização sob pressão de 40 Libras sem água por 5 min. na Panela Elétrica Semiautomática (Metal Vander®),

Piracicaba, SP), seis grupos de investigação foram constituídos de acordo com as soluções de extrato de plantas: óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, extrato alcoólico de *Hydrastis canadensis* e extrato alcoólico de *Casearia sylvestris* e gluconato de clorexidina, grupo controle com água destilada e grupo sem tratamento por 48h, para os protocolos I, II, III.

Protocolo I: ação mecânica por escovação

Desinfecção mecânica por escovação da superfície com escovas de cerdas duras durante um minuto três vezes ao dia, durante 30 dias.

A limpeza mecânica das resinas foi realizada esfregando sua superfície com movimento de vai. Ao final de cada ciclagem, os mesmos foram introduzidos em recipiente estéril fechado contendo saliva artificial, mantido em estufa bacteriológica a 37° C.

Protocolo II: ação química por imersão

Desinfecção química, realizada com a ciclagem em 10 minutos de imersão em 100 ml das soluções contempladas acima, três vezes ao dia, durante trinta dias. Ao final de cada ciclagem, os mesmos foram introduzidos em recipiente estéril fechado contendo saliva artificial, mantido em estufa bacteriológica a 37° C.

Protocolo III: ação mecânica e química

A associação da limpeza mecânica e química caracterizou esta etapa do procedimento, iniciando-se com a limpeza mecânica das resinas e seguida da ação química, conforme protocolo descrito acima.

A análise de resistência flexural, em Máquina de Ensaio Universal EMIC DL3000 - A norma ISO nº 1567, foi estabelecida após os processos de imersão das resinas nas soluções desinfetantes, de ação mecânica da escovação e da ação combinada pelos dois processos. Posteriormente, dois pontos equidistantes de sustentação foram utilizados, sendo aplicada força axial do corpo de prova e registrado o valor necessário para quebra em, Newton (N). O cálculo foi determinado pela fórmula $s = 3Fl/2bh^2$, onde s corresponde à resistência flexural em Mpa (megapascal), F é a carga máxima exercida sobre a amostra em Newtons, l é a distância entre os suportes (em milímetros), b a

largura da amostra (em milímetros) e h a altura do corpo de prova (em milímetros).

Resultados

Os grupos tratados com óleo essencial de *C. nardus* (protocolo II e III) foram excluídos da análise estatística, pois apresentaram danos estruturais da resina, impedindo a realização do ensaio de resistência flexural.

Os valores da resistência à flexão dos corpos de prova de resina acrílica estiveram dentro do padrão mínimo exigido pela Especificação 1567 da ISO de 60 Mpa. No entanto, diferenças estatísticas significantes foram observadas quando os protocolos I, II e III foram analisados. Neste sentido, a análise conjunta dos todos os grupos mostraram diferenças estatísticas significativas entre as médias de valores de resistência flexural (Teste de Tukey, $P < 0,05$) se comparados com o grupo controle, exceto o grupo 48 horas.

Comparando-se somente os protocolos I, II e III entre si, os resultados demonstram que não houveram diferenças significativas entre I e II para: GC Q, HC Q, CS Q, e III, com: GC QM, HC QM, CS QM ($p < 0,05$).

Quando as soluções desinfetantes foram comparadas de forma independente, diferenças estatísticas significantes foram observadas entre os protocolos II e III para *Hidrastis canadensis*.

A Tabela 1 apresenta as médias e o desvio padrão dos valores de resistência flexural, considerando-se os protocolos de limpeza e de desinfecção – convencionais, por extratos de planta e mecânico por escovação.

A média de valores para o grupo controle foi de 77,14 Mpa. Nota-se que o tratamento químico por HC Q, 61,77 Mpa promoveu maior interferência à resistência flexural, seguido ao CS Q ,62,28 Mpa e GC Q, 67,14 Mpa.

Discussão

As resinas acrílicas são compostas pelo pó de polimetilmetacrilato (PMMA) e monômero de metilmetacrilato (MMA) e, atualmente, é o material mais comumente usado para confecção de aparelhos ortodônticos removíveis^(14,15,16) com vantagens de custo reduzido, estética e de manuseio.^(1,17,18)

Embora, os protocolos de confecção incluam padrões rígidos de temperatura, tempo e manuseio, sua polimerização resulta em variações de superfície inerentes ao material.^(19,20,21)

Todos os corpos de prova, que receberam o protocolo de ação química, tiveram alterações na resistência flexural, no entanto, aqueles submetidos ao óleo essencial de *C. nardus*, as modificações foram expressivas, impossibilitando, neste grupo, a execução do teste de resistência flexural. Diante deste fato, trabalhos na literatura relatam que durante o procedimento de desinfecção a interação química entre soluções desinfetantes e a resina acrílica podem causar danos a esse material.^(22,23,24)

Na cavidade oral ocorrem interferências de ordem química, relacionados aos hábitos da dieta, o que promoveriam outros eventos sobre a superfície da resina. Esclarece-se pela atual pesquisa, que os resultados foram obtidos por ensaios *in vitro* e, que outros estudos de abordagem clínica são necessários, para comprovação do que se apresenta.

Os dados de resistência flexural para os métodos de desinfecção combinados, mecânico-químicos, foram discretamente inferiores se comparados aos individuais. Extrapola-se que a ação mecânica combinada com a química causou maior perda de material, devido o processo de lixiviação culminando na perda da estrutura resinosa e como consequência o aumento do risco de fratura do material.

Os procedimentos laboratoriais de desinfecção e armazenagem não foram completamente similares aos protocolos de outros estudos, uma vez que poucos consideram as resinas acrílicas específicas para aparelhos ortodônticos. Além disso, embora exista ampla diversidade de protocolos de desinfecção, os estabelecidos com extratos de plantas são raros, e com as da presente análise, inexistem.

Conclusão

O óleo essencial de *C. nardus* não deve compor nenhum protocolo de desinfecção química, dada a interação prejudicial á estrutura da resina acrílica.

Com base na metodologia utilizada e os resultados obtidos todas as soluções e todos os protocolos de desinfecção interferem na resistência flexural de resina acrílica, com destaque ao tratamento mecânico/químico com soluções de *H. canadensis* e *C. sylvestris*.

O protocolo mecânico de desinfecção deve ser indicado na prática odontológica uma vez que promoveu a menor interferência sobre a resistência flexural.

Novos estudos devem ser conduzidos com objetivos voltados à desinfecção de resinas acrílicas com produtos naturais, a partir de extratos de plantas, valorizada sua menor interferência sobre estas.

Referências

- 1- Lessa FCR, Ito CE, Yoko I, Faria G, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances Am J Orthod Dentofac Orthop 2007;131:705.e11-705.e17.
- 2- Srivastava B, Bhatia HP, Chaudhary V, Aggarwal A, Singh AK, Gupta N. Comparative evaluation of oral *Candida albicans* carriage in children with and without dental caries: a microbiological *in vivo* study Int J Clin Pediatr Dent 2012 May-Aug; 5(2): 108–112.
- 3- Pachava KR, Nadendla LK, Alluri LS, Tahseen H, Sajja NP Invitro antifungal evaluation of denture soft liner incorporated with tea tree oil: a new therapeutic approach towards denture stomatitis. J Clin Diagn Res 2015 Jun;9(6).
- 4- Krcmery V.; Barnes A.J. Non-albicans *Candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002;50:243.
- 5- Schwindling FS, Rammelsberg P, Stober T. Effect of chemical disinfection on the surface roughness of hard denture base materials: a systematic literature review. Int J Prosthodont 2014 maio/jun;27(3):215-25.
- 6- Silva FC, Kimpara ET, Mancini MNG, Balducci I, Jorge AOC, Koga-ItoCY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. J Prosthodont 2008;17:627–633.
- 7- Freitas MPM, Menezes LM, Rizzato SMD, Feldens JAI. Protocolo básico de biossegurança na clínica ortodôntica Rev. Clín. Ortodon. Dental Press, Maringá, 2006 abr/maio;5(2):78-82.

- 8- Rodrigues EA, Reis RF, Camargo RW. Eficácia de três desinfetantes em próteses totais à base de resina acrílica. *Odontol Mod* 1994 abr/jul;21(2):11-5.
- 9- Salvia AC, Matilde FS, Rosa FC, Kimpara ET, Jorge AO, Balducci I, Koga-Ito CY. Disinfection protocols to prevent cross-contamination between dental offices and prosthetic laboratories. *J Infect Public Health* 2013 out;6(5):377-82.
- 10- Khan, R., Zakir, M., et al. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal strains, *J Infect Dev Ctries* 2010;4:292.
- 11- Runyoro, D. K. B., Ngassapa, O. D., Matee, M. I. N., Joseph, C. C., Moshim. J. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of *Candida* infections, *J Ethnopharmacol* 2006;106:158.
- 12- Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali M, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin, *Molecules*, 2008.
- 13- Singh G, Kapoor IPS, Singh P, Heluani CS, Lampasona MP, Catalan, CAN. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicol* 2008;46:3295.
- 14- Straioto FG, Ricomini Filho AP, Fernandes Neto AJ, Del Bel Cury AA. Polytetrafluorethylene added to acrylic resins: mechanical properties. *Braz Dent J* 2010 Mar;21(1):55-59.
- 15- Jagger DC, Harrison A, Al-Marzoug K. Effect of the addition of Poly (methyl methacrylate) beads on some properties of acrylic resin *Int J Prosthodont* 2000;13(5):378-382.
- 16- Garcia FCP. Evaluation of the roughness and mass loss of the flowable composites after simulated tooth brushing abrasion. *Pesqui Odontol Bras* Apr 2004;18(2):156-161.
- 17- Pinto TMS, Neves ACC, Leão MVP, Jorge AOC. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci* 2008;16(6): 835-890.
- 18- Retamoso LG Influência do método de manipulação na topografia de superfície da resina acrílica autopolimerizável RGO, Porto Alegre 2009 jul/set;57(3):335-338.
- 19- Gonçalves TS, Spohr AM, Souza RM, Menezes LMM. Surface roughness of auto polymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. *Angle Orthodontist* 2008 set;78(5):931-934.

20- Suga SS, Pinto-Guedes AC, Simonato MRL. Avaliação in vitro da influência do polimento superficial de resina acrílica para aparelhos ortodônticos na adesão e remoção de *Streptococcus mutans** R Dental Press Ortodon Ortop Facial jan/fev 2005;10(1):94-107.

21- Souza RF, Regis RR, Nascimento C, Paranhos HFO, Silva CHL Domestic use of a disclosing solution for denture hygiene: a randomised trial. Gerodontology 2010; 27:193-198.

22- Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing – the best approach. Br Dent J 1995;178:413-7.

23- American Dental Association. Specifications n° 12 for denture base polymers. Councils on dental materials and devices, reports of councils and bureaus. J Am Dent Assoc 1975;90:39.

24- Davi LR, Peracini A, Soares RB, Silva CH, ParanhosHF. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. Gerodontology, 2010 dez;27(4):297-302.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Resultados de resistência flexural (MPa) dos corpos de prova tratados com os protocolos I, II e III.

MÉDIAS COMPARADAS PARA RESISTÊNCIA FLEXURAL e DESVIO PADRÃO	
Grupo controle	77,14 (5,39) A
Grupo 48 h	71,44 (8,15) A
Grupo Mecânico	68,35 (6,04) B
Grupo GC Q	67,14 (5,37) B
Grupo GC QM	64,97 (4,88) B
Grupo HC Q	61,77 (5,39) B
Grupo HC QM	60,73 (4,46) B
Grupo CS Q	62,28 (4,46) B
Grupo CS QM	61,31 (4,98) B

2.1.3. Artigo 3.**Effect of polymerization techniques and cleaning solution on flexural resistance of acrylic resin chemically activated**

Derly Tescaro Narcizo de Oliveira^a

Margarete Teresa Gottardo de Almeida^b

Maria Cristina Rosifini Alves Rezendes^c

André Pinheiro de Magalhães Bertoz^a

Renato Bigliuzzi^a

Francisco Antonio Bertoz^a

^aDepartment of Orthodontics, Dentistry School of Araçatuba – UNESP- Univ. Estadual Paulista

^bDepartment of Infectious Diseases, Inflammatory and Parasitic, Medical School of São José do Rio Preto – FAMERP

^cDepartment of Dental Material and Prosthesis, Dentistry School of Araçatuba – UNESP- Univ. Estadual Paulista

Corresponding author: Derly Tescaro Narcizo de Oliveira, Master in Orthodontics, Medical School of São José do Rio Preto– FAMERP. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro - 15090-000 São José do Rio Preto – SP

Abstract

Background: Removable appliances must provide security to the user of this orthodontic apparatus avoiding that the same fracture. The disinfectant products action on the physicochemical properties of acrylic resin guides its selection and leads the user to a safe cleaning protocol of removable orthodontic appliances.

Objective: To evaluate the flexural resistance of chemically-activated acrylic resin after cleaning in different disinfection solution by two polymerization

Materials and Methods: Forty test pieces were made with colorless acrylic resin (Clássico, Ind. & Com. Ltda. / Brazil), using a rectangular mold, followed by two techniques of polymerization under wet pressure (n = 20) and dry pressure (n = 20) and subdivided into 4 groups (n = 5) as the solution used for cycling: distilled water (Control), sodium bicarbonate, sodium hypochlorite 1% and effervescent tablets. The cycling consisted of immersion in 100 ml of solution for ten minutes three times a day and then maintained in a closed container containing artificial saliva at 37 ° C. These cycles were conducted during 30 days, changing the solutions and artificial saliva for each procedure performed. Latter, a mechanical test machine, EMIC DL3000, was used for the three-point flexural strength test, speed of 5mm/min, providing the sample in medium containing two restraints support. After that axial force was applied and equidistant to the two other points to the body to break the specimens. **Result:** There was no significant statistics difference between two polymerization techniques on the flexural strength. But the effervescent tablets and bicarbonate groups showed a statistics differences between them. **Conclusion:** The polymerization techniques did not alter the acrylic resin specimen's flexural strength; however, we found difference on flexural strength comparing the effervescent and sodium bicarbonate groups.

Key words: Polymethyl Methacrylate. Material Resistance. Disinfection.

Introduction

After completed induced movement of the teeth with fixed appliances, the use of a removable appliance is used in order to keep the teeth in position avoiding that they return to the initial position, prior to the orthodontics treatment¹. During the time of use of this removable appliance it must provide security to the user of this orthodontic apparatus avoiding that the same fracture or will serve as a niche for microorganisms². For these reasons, knowledge of all the variables that influence this stage of treatment should be discussed and filed in the literature in order to accomplish treatments with bases on scientific evidence.

In orthodontics, has not yet filed conventionally or an effective way to manipulate the acrylic resin and sanitize orthodontic appliance without damaging it. On the other hand, in the prosthesis efficient protocol for handling and disinfection of dental prostheses made of thermally polymerized acrylic resin, whose structure resembles chemically polymerized acrylic resin established in the literature, makes the management of these dentures during the time efficiency and safe keeping the properties of the acrylic resin as well as providing security for the carrier of such prostheses³.

With the same purpose, the materials used to prepare removable dental appliances must satisfy specific requirements so that the objectives of orthodontic treatment are fulfilled in particular those regarding aesthetics, longevity and strength⁴. Chemically-activated acrylic resins are the material of choice in the manufacture of removable appliances due to their specific characteristics such as low cost, good adaptation, biocompatibility, easy handling, satisfactory aesthetics and satisfactory resistance of fracture⁵.

The resin polymerization is a process that must be run as indicated in the technical literature⁵. The form of this polymerization would be in a moist, but some lab technicians made in dry which could cause changes in the structure of acrylic resin to the point of influencing the clinical use of removable appliance during treatment.

After polymerization the structure of chemically-activated acrylic resin can suffer the effects, either mechanical, such as the abrasive toothpastes, or

chemical such as cleaning agents, of external agents⁶⁻⁸. The cleaning of removable appliances using a toothbrush and toothpaste is contraindicated due to the damage caused by the abrasive particles to the surface of the resin which increases its roughness and promotes the retention of biofilm⁹. According to Diedrich¹⁰, brushing is ineffective to remove micro-organisms in difficult-to-clean areas of appliances. Damage to acrylic structures can also be caused by the chemical agents used to clean removable appliances. These substances contain agents that can damage or stain the surface of acrylic resin, as well as promote leaching of low molecular weight components, thereby increasing the roughness and a buildup of microorganisms on the appliance¹¹⁻¹³.

Thus, a polymerization technic due to a cleaning and disinfection protocol for removable appliances made with chemically-activated acrylic resin should be standardized, in particular in respect to orthodontics, with procedures that do not cause damage to the structure of the resin, including make it weaker and increase the pathogen microorganism biofilm on its surface. For these reasons, the aim of this work was to evaluate the flexural resistance of chemically-activated acrylic resin after cleaning in different disinfection solution by two polymerization technic.

Materials and Methods

Forty test pieces of chemically-activated acrylic resin were made with colorless self-curing acrylic resin using 2.5 parts of polymer to 1.0 part of monomer according to the manufacturer's recommendations (JET ®, Classic, Dental Products, SP).

A rectangular mold was used as specified in paragraph 12 of the rules of the American Dental Association (ADA)¹⁴. This norm determines that the following dimensions must be used in the three-point flexural strength test of acrylic resin: 65 mm long by 10 mm wide by 2.5 mm thick. To produce these test pieces stainless steel metal molds were made (67 mm x 12.60 mm x 3.00 mm). The size of the molds was intentionally larger than required by the ADA regulation to allow smoothing to produce a proper finish without the final size of

the test piece being too small. The sizes were measured using a digital pachymeter (Mitutoyo®, Japan).

Test pieces were made using the following two techniques: wet polymerization (n = 20) immersed in pressurized water (40 psi) at 40°C for 20 minutes in a semiautomatic electric cooker (Metal Vander®, Piracicaba, SP, Brazil) and dry polymerization (n = 20) under pressure (40 psi) for 20 minutes without water in a semiautomatic electric cooker (Metal Vander®, Piracicaba, SP, Brazil).

The test pieces were divided into two groups of four subgroups (n = 5) depending on the disinfectant solution used in the cleaning cycle: Control group (distilled water) Sodium Bicarbonate Group (20 grams of sodium bicarbonate diluted in 200 mL of distilled water) 1% Sodium Hypochlorite Group (Milton Liquid, Biodynamic SA, Ibiporã, Brazil) and Effervescent tablets Group (Corega Tabs®, GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brazil).

The 30-day cleaning cycle consisted in placing the test pieces in a container of artificial saliva at 37°C in a bacteriological incubator and immersing them in 100 mL of the disinfectant solutions for 10 minutes three times per day (8:00 a.m., 1:00 p.m. and 8:00 p.m.). The artificial saliva and disinfectant solutions were changed after each procedure.

At the end of this period the test pieces were placed in an EMIC DL3000 universal testing machine calibrated at a speed of 5 mm per second to perform the three-point flexural strength test. For this, the test pieces were placed on two metal supports and an axial force was applied equidistant from these two points until the test piece broke. The force needed to break the test piece was recorded in Newtons (N).

Results

Table 1 presents the mean and standard deviation of the flexural strength values for the two polymerization techniques and for the different cleaning agents. The results of this first analysis showed no statistically

significant differences among flexural strength, two polymerization techniques and the different cleaning agents (Table 1).

Considering the possibility of an interaction between the polymerization techniques and cleaning agents, an independent analysis of these different conditions was carried out (Table 2). When the types of cleaning solution in isolation were analyzed, a significant difference (p -value < 0.001 - ANOVA) was found between cleaning solutions. Hence, the Tukey test was applied

Considering the cleaning agents, regardless of the method of polymerization, sodium bicarbonate solution presented the lowest flexural strength, followed by the Control and Sodium Hypochlorite Groups and the highest flexural strength was found using Effervescent tablets (Table 3).

Discussion

The manner in which components are usually mixed together can lead to a lack of uniformity in the structure of the resulting acrylic resin¹⁵, as well as greater absorption of water¹⁶ that affect the mechanical properties of the polymers. Thus, irregularities in this mixture may favor porosity which, when present on the surface of the appliance, making daily cleaning difficult with the retention of residues and the development of microorganisms.

According to ISO standard 1567, a minimum flexural strength of 65 MPa is necessary for acrylic resins¹⁴. The flexural strength values obtained after cleaning using sodium bicarbonate solution were lower than this value whereas the values for the other cleaning agents were above the minimum limit.

According to this study, there were no statistically significant differences between the polymerization techniques (dry or wet), which leads us to believe that this variable does not act so imperatively.

Our results showed no significant differences in flexural resistance between test pieces produced using the two polymerization techniques (wet and dry); this may mean that other factors such as the environment might interact to modify the result.

Use of effervescent tablets is recommended for the cleaning of intra- and extra-oral acrylic resin prostheses¹⁷. When these tablets are dissolved in water

they form an alkaline peroxide solution. According to previous studies, effervescent tablets basically function by releasing oxygen which detaches food fragments and light stains¹⁸. Therefore, using these denture cleansers can cause hydrolysis and decomposition of polymerized acrylic resin¹⁹. Thus, one might think that the detachment of fragments increases the porosity of the material but this does not interfere in the flexural strength.

The results of this study indicate that there is no significant difference between disinfectants and polymerization methods in the study period in respect to the flexural resistance of test pieces. Goiato in 2010²⁰, on studying the action of disinfectants on heat-activated acrylic resin also did not observe any influence of disinfections on the flexural resistance.

Although there were no significant negative effects on flexural strength in respect to effervescent tablets, 1% sodium hypochlorite solutions used in this study; however, only the sodium bicarbonate solution showed significant negative effects on the flexural strength (Table 3).

The laboratory procedures of disinfection and storage in this study were not exactly the same as other study protocols, because, although there are few studies on specific acrylic resins for orthodontic appliances, there is great variability between those that do exist. It is important to note that many factors can influence the flexural resistance of acrylic resin, including the components used and particles from the environment²¹, porosity associated to the technique²² and surface flaws of the appliance²³.

Conclusion

Based on the methodology used and the results obtained the polymerization technique does not affect the flexural resistance of acrylic resin. However, sodium bicarbonate solution produced lower values of flexural resistance compared to the other disinfectants. The flexural strength values of the Control and 1% Sodium Hypochlorite Groups were similar but the highest values were observed in the Effervescent Tablets Group. Further studies to find a disinfection protocol with cleaning solutions acrylic resin for orthodontics appliance has to be done.

References

- 1- Sadowsky, C.; Schneider, B. J.; Begole, E. A.; Tahir, E. *Am J Orthod* 1994, 106, 243.
- 2- Suga, S. S.; Guedes-Pinto, A. C.; Simionato, M. R. L. *Rev Dent Press Ortodon Ortopedi Facial* 2005, 10, 94.
- 3- Hong, G.; Murata, H.; Li, Y.; Sadamori, S.; Hamada, T. *J Prosthet Dent* 2009, 101, 205.
- 4- Fernandes, A.U.; Portugal, A.; Veloso, L. R.; Goiato, M. C.; Santos, D. M. *Braz Oral Res* 2009, 23, 263.
- 5- Council on Dental Materials, Instruments and Equipment. *J Am Dent Assoc* 1983, 106, 77
- 6- Borges, L. H.; Domitti, S. S.; Consani, S. *Rev CROMG* 2000, 6, 68.
- 7- Silva, R. J.; Seixas, Z. A. *Int J Dent* 2008, 7, 125.
- 8- Requa-Clark, B.J. *Am Dent Assoc*, 1993, 106, 77
- 9- Sesma, N.; Takada, K. S.; Laganá, D. C.; Jaeger, R. G.; Azambuja Júnior, N. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1999, 53, 463
- 10- Diedrich, P. *Fortschr Kieferorthop* 1989, 50, 231.
- 11- Budtz-Jorgensen, E. *J Prosthet Dent* 1979, 42, 619.
- 12- Asad, T.; Watkinson A. C.; Huggett, R. *Int J Prosthodont* 1993, 6, 9.
- 13- Neppelenbroek, K. H.; Pavarina, A. C.; Vergani, C. E.; Giampaolo, E. T. *J Prosthet Dent* 2005, 93, 171.
- 14- American Dental Association. Specifications n° 12 for denture base polymers. Councils on dental materials and devices, reports of councils and bureaus. *J Am Dent Assoc* 1975; 90, 39.
- 15- Eliades, T.; Brantley, W. A. *Eur J Orthodon* 2000, 22, 13
- 16- Dogan, A.; Bek, B., Cevik, N. N.; Usanmaz, A. *J Dent* 1995, 23, 313
- 17- Goiato, M. C.; Zucolotti, B. C.; Mancuso, D. N.; dos Santos, D. M.; Pellizzer, E. P.; Verri, F. R. *J Craniofac Surg* 2010, 21, 1270.
- 18- Oliveira, L. V.; Mesquita, M. F.; Henriques, G. E.; Consani, R. L.; Fragoso, W. S. *J Appl Oral Sci* 2006, 14, 286.
- 19- Hong, G.; Murata, H.; Li, Y.; Sadamori, S.; Hamada, T. *J Prosthet Dent* 2009, 101, 205.

- 20- Fernandes, A. U.; Goiato, M. C.; Dos Santos, D. M. *Cont Lens Anterior Eye* 2010, 33, 124
- 21- Raizada, K.; Rani, D. *Contact Lens Anterior Eye* 2007, 30, 152.
- 22- Canadas, M. D.; Garcia, L. F.; Consani, S.; Pires-de-Souza, F.C. *J Prosthodont.* 2010,19,52.
- 23- Pavarina, A. C.; Pizzolitto, A. C.; Machado, A. L.; Vergani, C.E.; Giampolo, E.T. 2003 *J Oral Rehab*, 30, 532.

Lista de Legendas

Table 1. Mean values (standard deviation) for testing flexural strength (MPa).

* Different capital letters in the column denote statistically significant differences (P <.05).

Table 2. Results of Analysis of Variance (ANOVA) two factors.

*P<.05 denotes statistically significant difference. *gl*: degrees of freedom; SS: Sum of Squares; MS: Mean Square.

Table 3. Mean values (SDs) of the test flexural strength (MPa) for each disinfectant, regardless of the type of polymerization.

*Different capital letters in the column denote statistically significant differences (P <.05).

Tabels list

Tabel 1

Disinfectants	Polymerization	
	Wet	Dry
Control	67,31 (9,59)A	67,99 (7,80)A
Effervescent	76,59 (11,25)A	69,18 (2,86)A
Hypocrite	71,09 (8,69)A	68,55 (7,48)A
Bicabornate	62,58 (5,34)A	64,08 (3,94)A

Tabel 2

Variation Factors	<i>gl</i>	SS	MS	F	P
Polymerization	1	37,675	37,675	0,651	0,426
Disinfectant	3	484,031	161,344	2,789	0,056
Polymerization x disinfectant	3	122,542	40,847	0,706	0,555
Error	32	1851,345	57,855		
Total	39	2495,593			

Tabel 3

Disinfectante	Averages of maximum resistance (MPa)
Control	67,65 (8,25) AB
Effervescent	72,88 (8,67) A
Hypochlorite	69,82 (7,76) AB
Bicarbonat	63,33 (4,49) B

3 CONCLUSÃO

3 CONCLUSÃO

Extratos de *Hydrastis canadensis*, *Casearia sylvestris* e *Cymbopogon nardus* são compostos de ação antifúngica.

As soluções de *Casearia sylvestris* e *Hydrastis canadensis* são mais eficazes do que *Cymbopogon nardus* e Gluconato de clorexidina na remoção de biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* na superfície de resina acrílica, o que permite incluí-las como agentes antifúngicos potenciais.

Os protocolos de desinfecção mostram-se eficientes na remoção do biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* sobre a superfície dos corpos de provas confeccionados com resina acrílica autopolimerizável.

As diferentes técnicas de polimerização não influenciam clinicamente na resistência à flexão dos AORs.

Comparando-se todos os protocolo mecânico e químico associados é mais eficiente na remoção e ação inibitória sobre fungo.

Estudos futuros devem investigar os compostos ativos e modo de ação antimicrobiana, além de avaliar sua ação sinérgica ou antagônica com outros compostos.

Ensaio quanto à toxicidade e genotoxicidade devem seguir a esta pesquisa, viabilizando seu uso na prática clínica.

Novos protocolos de desinfecção de aparelhos ortodônticos se fazem necessários, na prática clínica, para evitar a formação de biofilme sobre sua superfície.

4 REFERÊNCIAS

4 REFERÊNCIAS

- 1- Lessa FCR, Ito CE, Yoko I, Faria G, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances Am J Orthod Dentofacial Orthop 2007;131:705.e11-705.e17.
- 2- Srivastava B, Bhatia HP, Chaudhary V, Aggarwal A, Singh AK, Gupta N. Comparative evaluation of oral *Candida albicans* carriage in children with and without dental caries: a microbiological *in vivo* study Int J Clin Pediatr Dent 2012 May-Aug; 5(2):108–112.
- 3- Pachava KR, Nadendla LK, Alluri LS, Tahseen H, Sajja NP In vitro antifungal evaluation of denture soft liner incorporated with tea tree oil: a new therapeutic approach towards denture stomatitis. J Clin Diagn Res 2015 Jun;9(6).
- 4- Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida spp.* causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002;50:243.
- 5- Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. Mycopath 2002;154:63.
- 6- Merseguel KB et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. BMC Inf Dis 2015;15:57.
- 7- Douglas JL. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends of Microbiol 2004;11:30.
- 8- Soll, DR. *Candida* biofilms: Is adhesion sexy? Current Biology 2008;18:717.
- 9- Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. Curr Gen 2013;59(4):251-264.
- 10- Khan R, Zakir M, et al. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal strains. J Infect Dev Ctries 2010;4:292.
- 11- Runyoro DKB, Ngassapa OD, Matee MIN, Joseph CC, Moshi MJ. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of *Candida* infections. J Ethnophar 2006;106:158.
- 12- Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali M, Siddiqui U, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules 2008.

-
- 13- Singh G, Kapoor IPS, Singh P, Heluani CS, Lampasona MP, Catalan CAN. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food and Ch Tox 2008;46: 3295.
 - 14- De Oliveira JR, de Castro VC, Vilela P das GF, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. BMC Compl and Alt Med 2013;13:208.
 - 15- Nakahara, K. et al. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). JARQ 2003;37:249.
 - 16- Sinha P, Srivastava S, Mishra N, Yadav NP. New perspectives on antiacne plant drugs: contribution to modern therapeutics. BioMed Res Int 2014;2014:301304.
 - 17- Mahady GB. In vitro susceptibility of helicobacter pylori to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. Phytother Res 2003;17:217.
 - 18- Wei GX, Xu X, Wu CD. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. Arch Oral Biol 2011;56:565.
 - 19- De Campos EP, Trombini LN, Rodrigues R, et al. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. BMC Res Notes 2015;8:269.
 - 20- Cavallari MM, Gimenes MA, Billot C, et al. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. Annals of Botany 2010;106(4):627-636.
 - 21- Cavallari MM, Billot C, Bouvet JM, Favreau B, Zucchi MI, Palmieri DA, Gimenes MA. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), a neotropical medicinal tree. Mol Ecol Resour 2008 Jul;8(4):802-4.
 - 22- Trecco A, Borges FA, Pierri EG, Santos AG, Chin CM; Herculano RD. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte Rev Ciênc Farm Básica Apl 2014;35(1):89-95.
 - 23- Parwani SR, Parwani RN, Chitnis PJ, Dadlani HP, Prasad SV. Comparative evaluation of anti-plaque efficacy of herbal and 0.2% Chlorhexidine gluconate mouthwash in a 4-day plaque re-growth study. J Indian Soc Periodontol 2013;17:72-7

-
- 24- Dalwai S, Rodrigues SJ, Baliga S, Shenoy VK, Shetty TB, Pai UY, Saldanha S. Comparative evaluation of antifungal action of tea tree oil, chlorhexidine gluconate and fluconazole on heat polymerized acrylic denture base resin - an in vitro study. Gerodontology. 2014 dez;19
 - 25- Philips RW. Skinner Materiais Dentários, 9 ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1993.
 - 26- Anusavice KJ. Philips Material Dentários, 10 ed. ; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1998
 - 27- Ribeiro ZEA, Koga-Ito CY, Matos BM. Comparação da atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina com e sem álcool sobre *Candida albicans*. Rev Fac de Odont São José dos Campos 2010;5297.
 - 28- Pitangui, N. S. et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. Biofouling 2012 agosto; 28(7);711-718.
 - 29- Seneviratne C J, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake L P *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. Proteomics 2008;8:2936-2947.
 - 30- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microb Reviews 2002;15(2):167-193.
 - 31- Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8(9):881-890.
 - 32- Hall-Stoodley, L, Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microb 2009;11:1034–1043
 - 33- Callister, W. D. Jr. Materials Science and Engineering. 5ªed. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000.
 - 34- Pammi M, Liang R, Hicks J, Mistretta T-A, Versalovic J. Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. BMC Microb 2013;13:257.
 - 35- Samaranayake YH, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW, Samaranayake LP. human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on Silicone Biomaterial Chang Y-F, ed. PLoS ONE 2013;8(5):e62902.
 - 36- Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, et al. Real-Time Microscopic Observation of *Candida* Biofilm Development and Effects Due to Micafungin and Fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 2013 maio;57(5): 2226–2230.

-
- 37- Koban I, Matthes R, Hübner N-O, et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär* 2012;7(1):Doc06.
- 38- Slater T. F., Sawyer B., Sträuh U. Studies on succinatetetrazolium reductase system. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963;77:383-393.
- 39- Doke SK, Raut JS, Dhawale S, Karuppaiyil SM. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. *J Gen Appl Microbiol* 2014;60:163-168.
- 40- Nett JE, Cain MT, Crawford K, Andes DR. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. *J Clin Microb* 2011;49(4):1426-1433.
- 41-. Ritter JE. Predicting lifetimes of materials and material structures. *Dent Mater* 1995;11(2):142-6.
- 42- Della Bona A, Anusavice KJ, Dehoff PH. Weibull analysis and flexural strength of hot-pressed core and veneered ceramic structures. *Dent Mater* 2003;19(7):663-9.
- 43-. Palenik CJ The effect of long-term disinfection on clinical contact surfaces. *J Am Dent Assoc.* 2012 maio;143(5):472-7.
- 44- Jafari AA, Falah Tafti A, Hoseiny SM, Kazemi A. Antifungal effect of zataria multiflora essence on experimentally contaminated acrylic resin plates with *Candida albicans*. *Iran Red Crescent Med J* 2015 jan;5:17(1).
- 45- Mukumoto M, Ohshima T, Ozaki M, Konishi H, Maeda N, Nakamura Y Effect of micro bubbled water on the removal of a biofilm attached to orthodontic appliances - an in vitro study. *Dent Mater J* 2012;31(5):821-7.
- 46- Eichenauer J, Serbesis C, Ruf S Cleaning removable orthodontic appliances: a survey. *J Orofac Orthop* 2011 out;72(5).
- 47- Babu JP, Garcia-Godoy F. In vitro comparison of commercial oral rinses on bacterial adhesion and their detachment from biofilm formed on hydroxyapatite disks. *Oral Health Prev Dent* 2014;12(4):365-71.