



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



VANESSA SALVADEGO DE QUEIROZ

Avaliação *in vitro* do efeito dose-resposta da nanoemulsão do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* sobre células planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* e sobre a desmineralização do esmalte dental ao redor de braquetes ortodônticos

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



Avaliação *in vitro* do efeito dose-resposta da nanoemulsão do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* sobre células planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* e sobre a desmineralização do esmalte dental ao redor de braquetes ortodônticos

VANESSA SALVADEGO DE QUEIROZ

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - FCM, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção de Título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação da Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber e co-orientação da Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques.

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Q32e Queiroz, Vanessa Salvadego de, 1980 -
Avaliação *in vitro* do efeito dose-resposta da nanoemulsão do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* sobre células planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* e sobre a desmineralização do esmalte dental ao redor de braquetes ortodônticos / Vanessa Salvadego de Queiroz. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Angélica Zaninelli Schreiber.
Coorientador: Márcia Ortiz Mayo Marques.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cariologia. 2. Ortodontia. 3. Fitoterapia. 4. Microbiologia. 5. Nanotecnologia. I. Schreider, Angélica Zaninelli. II. Marques, Márcia Ortiz Mayo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: *In vitro* evaluation of dose-response effect of ethanolic extract nanoemulsion of *Lychnophora pinaster* on *Streptococcus mutans* planktonic cells and biofilm, as well as on dental enamel demineralization around orthodontic brackets

Palavras-chave em inglês:

Cariology

Orthodontics

Phytotherapy

Microbiology

Nanotechnology

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Angélica Zaninelli Schreiber [Orientador]

Adriana Franco Paes Leme

Cinthia Machado Tabchoury

Cristiane Yumi Koga Ito

Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Data da defesa: 10-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Vanessa Salvadego de Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber
Co-Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Adriana Franco Paes Leme

Adriana Franco Paes Leme

Professor (a) Doutor (a) Cristiane Yumi Koga Ito

Cristiane Yumi Koga Ito

Professor (a) Doutor (a) Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Professor (a) Doutor (a) Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Professor (a) Doutor (a) Angélica Zaninelli Schreiber

Angélica Zaninelli Schreiber

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/02/2012

Dedicatória

À Deus,

que se revela a cada instante em nossas vidas e nos permite tantas realizações...

Ao meu pai Messias,

pela dedicação, incentivo e, sobretudo, pelo amor e carinho.

que me dedicou em todos os passos de minha vida...

... e por todas as noites mal dormidas e pelo despertar de todas as manhãs...

sem você, meu querido pai, o meu mundo tornar-se-ia incompleto...

À minha mãe Ires,

que para retribuir pelas tantas horas de dedicação e amor, só minha eterna gratidão...

... sem seu incansável apoio em todos os dias de minha vida

eu não seria capaz de realizar este e nem nenhum outro trabalho...

mãe, tu és o que há de mais sublime na face da Terra... algo insubstituível...

Ao meu irmão Dahyl,

verdadeiro amigo e exemplo de dedicação e determinação...

que me ampara sempre e com quem aprendo a cada dia...

somente pessoas especiais são capazes de demonstrar grandeza de coração

em pequenos gestos... Pessoas como você! Admiro-te muito!

Ao meu grande amor Fabiano,

por compartilhar sonhos e planos e por todos os momentos que temos passado juntos.

... muito obrigada por todo amor, incentivo, apoio, paciência...

mas principalmente por fazer parte da minha vida! Te amo muito!

... amar não é olhar um para o outro, é olhar juntos na mesma direção.

Dedicatória

*À minha grande e amorosa Família Salvadego...
aos meus avós Sra. Dusolina (em memória) e Sr. Fiorindo (em memória)...
aos meus tios Angelina, Antoninho, Lídio, Rita, Sueli, Terezinha e os seus...
e em especial...*

*à minha tia e madrinha Ana Maria,
por toda atenção, carinho e apoio em todos os momentos...
ao meu tio Pe. Ildefonso,
pelo exemplo de dedicação e amor e pelas importantes lições transmitidas...
e à minha tia Marizete e os seus...
pela amizade, carinho e importante contribuição em minha formação...*

*À minha nova e acolhedora Família Tedesco...
... em especial Sr. Alcides, Sra. Giovannina...
Ana Cláudia, Anna Fábria, Anna Júlia e Fábio...
por todo carinho, apoio, incentivo...
mas principalmente por me receberem com tanto carinho junto a vocês.*

*Mais que a alegria de uma convivência, apoio mútuo e ideais comuns,
a amizade e o carinho de vocês me faz acreditar na vida...
A todos vocês devo a pessoa que sou e a profissional que estou me tornando.*

Agradecimentos Especiais

A minha Orientadora, Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber, Professora do Departamento de Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pela atenção e cordialidade de sempre, que são provas de seu profundo conhecimento... por todos os ensinamentos e oportunidades, expresse minha gratidão e respeito. Suas atitudes sempre marcaram pela serenidade, sabedoria e generosidade...

A minha Co-orientadora, Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, Pesquisadora do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais, do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, pela inestimável ajuda na realização deste trabalho e em todos os momentos... mas principalmente por me acolher com tanto carinho e amizade... Você me ensinou que nada é impossível quando se tem um ideal...

*Na seca conhecem-se as boas fontes e na dificuldade, os bons amigos...
Muitas pessoas entrarão e sairão em nossas vidas,
mas apenas os amigos verdadeiros deixarão pegadas em nossos corações.
Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós,
deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.*

Agradecimentos

*À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP,
na pessoa do magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.*

*À Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP,
na pessoa do digníssimo Diretor Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad.*

*À Comissão de Pós Graduação em Ciências Médicas - FCM/UNICAMP,
na pessoa do digníssimo Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira.*

*Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas - FCM/UNICAMP,
na pessoa da digníssima Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta.*

*À Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP,
nas pessoas das digníssimas Cleide Silva (Bioestatística) e Etna Macário (Tradução).*

*À Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP,
Programa de Ciências Médicas, na pessoa da digníssima Márcia Santos (Secretária).*

*Ao Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas -
FCM/UNICAMP, na pessoa da digníssima Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto.*

*À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado,
que tornou possível o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme, Pesquisadora do Laboratório Nacional de Biociências, da Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Sincontron - LNBIO/ABTLUS, pelos importantes apontamentos e pela fundamental contribuição neste trabalho.

À Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Professora da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas - FOP/UNICAMP, pela atenção e cordialidade de sempre, que são provas de seu profundo conhecimento.

À Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito, Professora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - FOSJC/UNESP, por toda dedicação, incentivo e colaboração na conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga, Professor Pesquisador vinculado à Pós-Graduação em Odontologia, no Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic - FO/SLMANDIC, pela atenção, disponibilidade e importante contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero, Professor do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas - IQ/UNICAMP, pelo exemplo de dedicação à profissão e pelos importantes ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, Pesquisadora do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas - IQ/UNICAMP, pelo incentivo, esclarecimentos e fundamental ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber e aos amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia, da Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP...

por toda ajuda e paciência de sempre...

*em especial à Luzia Lyra, pela importante ajuda e dedicação,
mas principalmente por todos momentos, conversas e abraços...*

À Profa. Dra. Maria Luiza Moretti e aos amigos e funcionários do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, da Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP... pela disponibilidade de sempre.

Ao Prof. Dr. Roger Frigerio Castilho e aos amigos e funcionários do Laboratório de Metabolismo Energético em Neurodegeneração, da Faculdade de Ciências Médicas - FCM/UNICAMP... pelo importante apoio em todos os momentos...

*Ao Prof. Nelson E. Durán Caballero e aos amigos e funcionários do Laboratório de Química Biológica, do Instituto de Química - IQ/UNICAMP...
pela importante ajuda, pela dedicação e disponibilidade em todos os momentos...
em especial ao Elias Berni, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho...
e principalmente pela paciência de sempre.*

Agradecimentos

*À Profa. Marcia Ortiz Mayo Marques e aos amigos e funcionários do Laboratório de Fitoquímica, do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais, do IAC, pelos ensinamentos, incentivo e dedicação de sempre...
... em especial à Daniela Matsumoto, pelo apoio e ajuda constante.*

Ao Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury e aos amigos e funcionários do Laboratório de Bioquímica Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP... pela oportunidade a mim concedida, por toda confiança depositada e todos ensinamentos... em especial ao Waldomiro Vieira, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

*Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho e aos amigos e funcionários do Laboratório de Materiais Dentários, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, pela disponibilidade, paciência e simpatia de sempre...
... em especial ao Marcos Cangiani, pela paciência e apoio constante.*

*À Profa. Marta Cristina Teixeira Duarte e aos amigos e funcionários da Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP
... pela colaboração, carinho e incentivo em todos os momentos.*

*À Profa. Vera Lúcia Garcia Hehder da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP
... pela dedicação, disponibilidade e apoio de sempre.*

Agradecimentos

Aos amigos de Graduação FOP/UNICAMP: Alice Carezzato, Aline Uratani, Carolina Steiner, Carlos Henrique Máximo, Débora Coelho, Fernanda Ribeiro, Giovana Lécio, Gustavo Burato, Ingrid Morita, Lília Rocha, Luis Gustavo da Silva, Marcelo Costella, Maurício Lemos, Murilo Galli, Morgana Gabriotti, Paola Azoni, Regina Moura, Renato Casarin, Thalita Oliveira e Viviam Hori.

Aos amigos de Pós-Graduação FOP/UNICAMP: Ana Cristina Arraval, Ana Zilda Carvalho, Paola Azoni, Ricardo Souza, Roberta Vieira e Viviane Tamburus.

Aos outros importantes amigos da FOP/UNICAMP... Daiane Peruzzo, Márcio Mishima, Tatiana Normanha... e em especial ao Renzo Ccahuana-Vásquez pela inestimável ajuda.

Às amigas da FCM/UNICAMP: Ana Paula Sartori, Fernanda Biancalana, Fernanda Valiero, Gabriela Gusmão, Maria Fernanda Froner, Talita Ferreira e Thianna Teixeira.

Às queridas e inesquecíveis amigas do IAC... Maria Vieira, Roselaine Facanali, Talita Lima... e em especial a Lenita Haber pela importante ajuda.

Às amigas de sempre: Daniela Mendonça, Ellen Nakazawa, Fernanda Gomes, Gislene Splendore, Juliana Hayashi (em memória), Kamila Branciforti, Laura Maranhã, Lina Ishikawa, Maria Angélica Tiritil, Renata Apezzato, Suzan Yu e Tatiane Grandin.

... simplesmente imprescindíveis em minha vida!!!

Obrigada pela amizade, por todos os momentos e ensinamentos... cada um a sua maneira.

*Enfim, aos amigos de sempre e aos aqui conquistados,
por todo companheirismo e alegrias compartilhadas.*

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito dose-resposta da nanoemulsão do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* sobre células planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 ATCC700610 e sobre a desmineralização do esmalte dental ao redor de braquetes ortodônticos. Além disso, foi avaliada a associação do íon flúor (F⁻), contido em um dos materiais de colagem de braquetes (Fuji Ortho LC), com a nanoemulsão, assim como a interferência da mesma sobre a força de adesão dos braquetes. Com as células planctônicas foram realizados Testes de Disco Difusão (DD), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A formação do biofilme sobre blocos de esmalte dental bovino, tendo braquetes Synergy colados, foi induzida utilizando-se meio de cultura Müller Hinton cátion ajustado (CLSI M7-A6), com exposição 8x/dia, durante 1 minuto, a sacarose 10%. Os blocos foram divididos em experimentos de acordo com o material de colagem, Transbond XT ou Fuji Ortho LC. Para cada material foram avaliados 6 grupos (n=4); 2 controles negativos (48 e 120 horas), 3 experimentais (nanoemulsão na CIM; CIM x 100; CIM x 1000) e 1 controle positivo (digluconato de clorexidina - CHX 0,12%), sendo que os experimentos foram realizados em duplicata. Após 48 horas, os biofilmes foram tratados 2x/dia, durante 1 minuto, com NaCl 0,9% (controle negativo), nanoemulsão (experimentais), ou CHX 0,12% (controle positivo). Os meios foram trocados a cada 12 horas e o pH mensurado a cada troca para avaliar a acidogenicidade do biofilme. Após 120 horas os biofilmes foram coletados e foi determinado peso seco, micro-organismos viáveis (UFC) e concentração de F⁻. A desmineralização do esmalte dental foi determinada em secção transversal (ΔZ), nas posições 0, 100 e 500 μm de distância do braquete e foi verificada a resistência ao cisalhamento dos braquetes de acordo com os materiais de colagem. Os resultados demonstraram que o halo inibitório da nanoemulsão foi similar ao da CHX 0,12% e a CIM/CBM se apresentaram abaixo de 500 $\mu\text{g/mL}$, o que indica uma forte inibição ao *Streptococcus mutans* UA159 ATCC700610. No biofilme formado utilizando ambos os materiais de colagem, a nanoemulsão CIM x 1000 foi similar a CHX 0,12% na diminuição da UFC/peso seco. Quanto à desmineralização, utilizando Transbond XT, a nanoemulsão CIM x 100 ou 1000 foi similar a CHX 0,12% e utilizando Fuji Ortho LC, a nanoemulsão a

partir da CIM foi similar a CHX 0,12%. Para todos os grupos, a distância 0 µm apresentou maior desmineralização que as distâncias 100 e 500. A média de resistência ao cisalhamento do experimento utilizando Transbond XT foi superior a do experimento utilizando Fuji Ortho LC, porém não houve diferença entre os grupos em nenhum dos experimentos. Os resultados sugerem que a nanoemulsão do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* foi efetiva contra células planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 ATCC700610 e sobre a desmineralização do esmalte dental ao redor de braquetes ortodônticos, sem interferir na força de adesão dos braquetes, sendo que combinada ao F⁻ do Fuji Ortho LC, o efeito de inibição da desmineralização foi potencializado.

Palavras-chave: Cariologia, Ortodontia, Fitoterapia, Microbiologia, Nanotecnologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* dose-response effect of ethanolic extract nanoemulsion of *Lychnophora pinaster* on planktonic cells and biofilm of *Streptococcus mutans* UA159 ATCC700610, as well as on dental enamel demineralization around orthodontic brackets. Moreover, it was evaluate the association of the ion fluoride (F^-), contained in one of the bracket bond materials (Fuji Ortho LC), with the nanoemulsion, as well as the interference of the nanoemulsion on the brackets bond strength. With planktonic cells, the following tests were performed: Disk Diffusion Testing (DD), Minimal Inhibitory Concentration (MIC), and Minimal Bactericidal Concentration (MBC). The biofilm was formed on bovine enamel blocks, in which Synergy brackets were bonded, using cation adjusted Müller Hinton broth medium (CLSI M7-A6), exposed to 10% sucrose, during 1, minute 8x/day. The blocks were divided into experiments, according to the brackets bond materials, i.e., Transbond XT or Fuji Ortho LC. Six groups (n=4) were evaluated for each material, i.e., two negative control groups (48 and 120 hours), three experimental groups (nanoemulsion at MIC; MIC x 100; MIC x 1000) and one positive control group (chlorhexidine digluconate - 0.12% CHX), considering that the experiments were performed in duplicate. After 48 hours, biofilms were treated 2x/day, during 1 minute, with 0.9% NaCl (negative control group), nanoemulsion (experimental groups) or 0.12% CHX (positive control group). The media was changed every 12 hours and the pH was determined every change to evaluate the biofilm acidogenicity. After 120 hours the biofilms were collected and it was determined dry weight, viable microorganisms (UFC) and F^- concentration. The dental enamel demineralization was determined in transverse section (ΔZ) on positions 0, 100 and 500 μm of distance from the bracket, and it was evaluate the brackets shear strength according to bond materials. The results showed that the nanoemulsion presents the same inhibitory halo than 0.12% CHX and a MIC/MBC lower than 500 $\mu g/mL$, that indicates a higher inhibition of *Streptococcus mutans* UA159 ATCC700610. Regarding the biofilm formed with both materials, the nanoemulsion 1000 x MIC was similar to 0.12% CHX in the UFC/dry weight reduction. Concerning the demineralization, using Transbond XT, the nanoemulsion 100 and 1000 x MIC was similar to CHX 0.12%, and using Fuji Ortho LC, the nanoemulsion at MIC was similar to 0.12%

CHX. For all groups, the distance 0 μm presented higher demineralization than the distances 100 and 500. The mean shear bond strength for Transbond XT experiment was higher than Fuji Ortho LC experiment, however did not have difference among groups in none of the experiments. The results suggest that the ethanolic extract nanoemulsion of *Lychnophora pinaster* was effective against *Streptococcus mutans* UA159 ATCC700610 planktonic cells and biofilm, as well as on dental enamel demineralization around orthodontic brackets, without interfere on brackets bond strength, and in association with the Fuji Ortho LC F, the demineralization inhibition effect was enhanced.

Keywords: Cariology, Orthodontics, Phytotherapy, Microbiology, Nanotechnology.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é “muito” para ser insignificante.”

Charles Chaplin

