

Lek. dent. Aleksandra Szram

# **Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych i mechanicznych materiału kompozytowego modyfikowanego olejkiem eterycznym**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor: dr hab. n. med. Monika Łukomska-Szymańska, prof. Uczelni**

**Promotor pomocniczy: dr n. med. Monika Domarecka**

**Zakład Stomatologii Ogólnej  
Katedra Stomatologii Odtwórczej  
Wydział Lekarski**



Łódź 2020

Próchnica zębów, zarówno pierwotna jak i wtórna, obejmuje tkanki twarde zęba tj. szkliwo, zębinę i cement korzeniowy oraz jest przyczyną stanów zapalnych miazgi i tkanek okołowierzchołkowych. Jednym z głównych czynników etiologicznych próchnicy są bakterie, szczególnie szczepy *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus acidophilus*. Należy jednak podkreślić, że ekologia mikrobiologiczna jamy ustnej jest bardzo złożona, a wyniki ostatnich badań wskazują na próchnicotwórczy i synergistyczny wpływ *Candida albicans* na próchnictwórczą aktywność *S. mutans*. Od dłuższego czasu postuluje się stosowanie substancji o działaniu przeciwbakteryjnym w procesie odbudowy tkanek twardych zębów.

W ostatnich latach skład materiałów stomatologicznych wzbogacono o związki, które wykazują aktywność przeciwbakteryjną, m.in. o diglukonian chlorheksydyny, nanosrebro, bromek metakryloiloksydodecylpirydyniowy (MDPB), sole amoniowe i związki fluoru. Olejki eteryczne jako związki o dowiedzionym szerokim działaniu przeciwbakteryjnym mogą być alternatywą dla wyżej wymienionych substancji – poprzez wzmocnienie potencjału antybakteryjnego materiałów kompozytowych. Właściwości olejków są bowiem wszechstronne-działają bakteriostatycznie, przeciwzapalnie, antykancerogennie i przeciwgrzybiczo. Możliwości szerszego zastosowania olejków w połączeniu z materiałami kompozytowymi pozostają zagadnieniem nie do końca zbadanym.

### **Cel pracy**

Celem niniejszej pracy była:

1. Ocena właściwości przeciwbakteryjnych różnych olejków eterycznych.
2. Ocena możliwości poprawy właściwości przeciwbakteryjnych materiału kompozytowego poprzez dodatek do niego olejku eterycznego.
3. Ocena parametrów wytrzymałościowych materiałów kompozytowych zmodyfikowanych olejkami eterycznymi.

### **Materiały**

W badaniach wykorzystano materiał kompozytowy SDR (Dentsply, Niemcy) i 10 olejków eterycznych (Dr Beta, Polska): tymiankowy, cynamonowy, limetkowy, miętowy, geraniowy, cytronelowy, goździkowy, anyżowy, rozmarynowy i lawendowy.

### **Metody badań**

Przeprowadzono badania oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych i wytrzymałościowych.

### **Badania mikrobiologiczne**

Ocenę działania **przeciwdrobnoustrojowego** olejków eterycznych wykonano w 2 etapach:

- **Etap I** – metoda krążkowo-dyfuzyjna

Miał on na celu ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych olejków eterycznych wobec badanych patogenów oraz wybór olejku, który wykaże największą strefę zahamowania wzrostu drobnoustrojów.

Do określenia działania przeciwbakteryjnego olejków wobec drobnoustrojów *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 i *Candida albicans* ATCC 10231 wykorzystano metodę krążkowo-dyfuzyjną. Za pomocą pipety nakropiono 6 µl ocenianego ekstraktu olejku eterycznego na papierowy krążek dyfuzyjny, który znajdował się na podłożu. Grupę kontrolną stanowił roztwór 0,2% procentowego diglukonianu chlorheksydyny. Badanie wykonano w 12 powtórzeniach dla każdego olejku w danym środowisku. Po 24 godzinach inkubacji odczytano średnicę strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju.

– **Etap II** – metoda kolejnych rozcieńczeń eluatów

Miał on na celu poddanie ocenie przeciwbakteryjnego działania materiału kompozytowego, który zmodyfikowano wybranym olejkiem.

Materiał SDR połączono mechanicznie z wybranym olejkiem eterycznym w 3 stężeniach (1 µl/2 g, 2 µl/2 g i 5 µl/2 g) do uzyskania jednolitej konsystencji. Grupę kontrolną stanowiły próbki niezmodyfikowanego materiału kompozytowego. Próbki wykonano w kształcie walca i utwardzono za pomocą lampy halogenowej. Do oceny działania przeciwbakteryjnego materiału kompozytowego SDR, który zmodyfikowano olejkami, zastosowano metodę eluatów. Oceniono właściwości przeciwbakteryjne wobec *S. mutans*, *L. acidophilus* i *C. albicans*. Przygotowane próbki materiału kompozytowego umieszczano w 2,5 ml roztworu 0,95% NaCl i inkubowano 24 godziny w temperaturze 35°C. Następnie pobierano 1,8 ml eluatu. W przygotowanym eluacie wykonano szeregi rozcieńczeń badanych szczepów. Szczepy inkubowano 18 godzin w uzyskanych eluatach. Grupą kontrolną dla 3 grup badanych była próbka materiału kompozytowego niezmodyfikowanego olejkiem. Po inkubacji wykonano posiew 100 µl kontroli i zawiesiny bakteryjnej (z każdego rozcieńczenia) w eluacie na podłoża do określania lekowrażliwości drobnoustrojów. Po zakończeniu okresu hodowli zliczono kolonie na wszystkich płytkach. Wykonano 12 powtórzeń dla każdego stężenia olejku oraz kontroli w danym środowisku.

### **Badania wytrzymałościowe**

Do badania wytrzymałości na trójpunktowe zginanie (ang. Three point bending test - TPB) przygotowano próbki zgodnie z normą (PN-EN 4049:2003). Badanie wykonano w uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick/Roell Z020 (Zwick/Roell Zhµ, Niemcy) przy prędkości przesuwu trawersu 0,75 mm/min. Wykonano po 11 próbek dla każdej z grup.

Próbki do badania średnicowej wytrzymałości na rozciąganie (ang. Diametral Tensile Strength – DTS) przygotowano zgodnie z normą (ANSI ADA no. 55). Badanie średnicowej wytrzymałości na rozciąganie wykonano w urządzeniu Zwick/Roell Z020 przy prędkości przesuwu głowicy równej 0,5 mm/min. Wykonano po 11 próbek dla każdej z grup.

Do badania pomiaru twardości przygotowano próbki zgodnie z normą (Polska Norma PN-EN ISO 6507-1). Badanie przeprowadzono za pomocą mikrotwardościomierza z indenterem Vickersa (Urządzenie Zwick/Roell Zhμ). Obciążenie indentera wynosiło 1 kg, a czas obciążenia wynosił 10 s (HV1). Wykonano po 7 próbek dla grup badanych i kontrolnej. Dla każdej próbki przeprowadzono 3 pomiary twardości.

Wyniki zostały poddane analizie jednoczynnikowej. Wyniki uznane są za istotne statystycznie gdy  $p < 0,05$  zarówno w badaniach mikrobiologicznych oraz wytrzymałościowych.

## **Wyniki badań**

### ***Wyniki badań mikrobiologicznych***

W etapie I badań mikrobiologicznych największą strefę zahamowania wzrostu *S. mutans* wykazał olejek cyjanonowy ( $39,17 \pm 1,4$  mm), a brak tej strefy stwierdzono w przypadku olejku anyżowego i limetkowego. Dla *L. acidophilus* największą strefę zahamowania wzrostu zaobserwowano w przypadku olejku tymiankowego ( $39,83 \pm 1,09$  mm) i cyjanonowego ( $39,64 \pm 0,99$  mm), a najmniejszą dla olejku rozmarynowego ( $9,05 \pm 0,44$  mm). Dla *C. albicans* największą strefę zahamowania wzrostu zanotowano dla olejku cyjanonowego ( $54,87 \pm 2,42$  mm), a najmniejszą dla olejku limetkowego ( $11,67 \pm 0,78$  mm).

W etapie II wykorzystano do badań olejek cyjanonowy. Zaobserwowano, że najmniejsza liczba wyrosłych kolonii bakteryjnych *S. mutans* i *C. albicans* wyrosła przy stężeniu olejku cyjanonowego 2 μl/2 g, a największa – dla grupy kontrolnej. Najmniejsza wartość wyrosłych kolonii bakteryjnych *L. acidophilus* pojawiła się przy stężeniu olejku cyjanonowego 1 μl/2 g, a największa-dla grupy kontrolnej.

Różnice istotne statystycznie stwierdzono między grupą kontrolną a wszystkimi grupami badanymi oraz między grupą 1 μl/2 g a grupami 2 μl/2 g i 5 μl/2 g, oraz między grupą 2 μl/2 g a grupą 5 μl/2 g.

### ***Wyniki badań wytrzymałościowych***

W badaniach wytrzymałościowych materiał kompozytowy został zmodyfikowany olejkiem cyjanonowym w odpowiednim stężeniu.

Najwyższą średnią wytrzymałość w teście TPB stwierdzono dla olejku cyjanonowego w stężeniu 1 μl/2 g ( $62,25 \pm 12,23$  MPa), a najniższą dla olejku cyjanonowego w stężeniu

5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  ( $23,93\pm 18,45\text{ MPa}$ ). Wartość TPB była znacząco statystycznie wyższa dla olejku eterycznego w stężeniu 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  w porównaniu z grupą kontrolną i pozostałymi grupami badanymi tj. 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  i 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

Najwyższą wartość DTS zanotowano dla grupy kontrolnej ( $36,3\pm 3,58\text{ MPa}$ ), a najniższą dla grupy badanej z olejkiem cynamonowym w stężeniu 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  ( $31,36\pm 5,49\text{ MPa}$ ). Wartości DTS były znacząco statystycznie wyższe dla grupy kontrolnej oraz dla grupy 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  w porównaniu do grup 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  i 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

Najwyższa wartość HV1 dotyczyła grupy kontrolnej ( $34,95\pm 3,32$ ), a najniższa – grupy badanej 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  ( $23,86\pm 4,54$ ). Twardość była istotnie statystycznie wyższa dla grupy kontrolnej w porównaniu z wszystkimi grupami badanymi. Twardość była znacząco statystycznie niższa dla stężenia 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  w porównaniu do stężenia 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  oraz 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

### **Wnioski**

1. Większość olejków eterycznych (z wyłączeniem olejku anyżowego i limetkowego wobec *S. mutans*) wykazała aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów.
2. Olejek cynamonowy wykazał najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec wszystkich badanych szczepów.
3. Materiał kompozytowy modyfikowany olejkiem cynamonowym (stężenie 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ ) działał silniej przeciwbakteryjnie wobec *S. mutans*, *L. acidophilus* i *C. albicans* niż komercyjny materiał kompozytowy, przy zachowanych właściwościach mechanicznych.

Aleksandra Szram

**Evaluation of antimicrobial and mechanical properties  
of composite material modified with essential oil**

Doctoral dissertation

**Thesis supervisor: dr hab. n. med. Monika Łukomska-Szymańska**

**Adjuvant thesis supervisor : dr n. med. Monika Domarecka**

**Department of General Dentistry  
Faculty of Medicine**



Lodz 2020

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Both, the problem of primary and recurrent caries concerns hard tissue of teeth: enamel, dentine and root cement. Caries may lead to inflammatory process of both pulp and periapical tissue. The main reason for caries are *S. mutans* and *L. acidophilus*. *C. albicans* is also stated to enhance caries development and acts synergically with *S. mutans*. The introduction of substances enhancing antimicrobial properties of dental materials may be a solution for this complex problem.

Recently, such substances as chlorhexidine, nanosilver, MDPB, ammonium salts and fluoride compounds have been added to composite materials to enhance their antibacterial properties. Essential oils may set an alternative for mentioned compounds. Their spectrum of activeness is scientifically proved and comprises antibacterial, antiviral, antifungal and even anticancerogenic properties. The possibility of combining essential oil and composite material may turn out to be a promising field to explore.

### **The aim**

The aim of the research was:

1. Evaluation of antimicrobial properties of essential oils.
2. Evaluation of possible enhancement of antimicrobial properties of composite material modified with essential oil.
3. Evaluation of mechanical properties of composite material modified with essential oil.

### **Materials**

In the study SDR composite (DENTSPLY Sirona, USA) and 10 natural essential oils (dr Beta, Poland) were used: thyme oil, cinnamon oil, lime oil, mint oil, geranium oil, citronella oil, clove oil, anise oil, rosemary oil, and lavender oil.

### **Methods**

Mechanical and antibacterial properties were evaluated. Antimicrobial properties of essential oils were carried out in 2 stages

#### **Evaluation of antimicrobial properties**

The evaluation of antimicrobial properties of essential oils was carried out in 2 stages:

##### ***Stage I – agar diffusion test***

The aim was to evaluate antimicrobial properties of essential oils against pathogens and choose essential oil with the biggest inhibitory zones.

Antimicrobial properties of essential oils against *S. mutans* ATCC 25175, *L. acidophilus* ATCC 4356 and *C. albicans* ATC 10231 were examined with usage of agar diffusion method. 6µl of oil extract and control was applied to each diffusion disc with the usage of pipette. 0.2% sol. of chlorhexidine stated as a control. The experiment was repeated 12 times for each essential oil and

control in each condition. The inhibition zones were recorded for each diffusion disc after 24 hours of incubation.

### **Stage II – broth dilution test**

The aim of this stage was to evaluate antimicrobial properties of composite material modified with essential oil.

SDR material was combined with essential oil mechanically in 3 concentrations (1 µl/2 g, 2 µl/2 g, 5 µl/2 g). The control group was a unmodified composite material sample. Samples were made in cylinder shape and polymerized with halogen lamp. To examine antimicrobial properties of SDR material modified with essential oil the broth dilution test was used. Microbiological studies were made on three strains: *S. mutans*, *L. acidophilus* and *C. albicans*. The prepared samples were stored in 2.5 ml of 0.95% sol. of NaCl and incubated for 24 hours in 35°C. Afterwards 1.8 ml of an eluate was transferred to prepare subsequent bacterial strain dilutions. Strains were incubated for 18 hours in eluates. After incubation 100 µl of bacterial suspension was transferred into substrate to determine bacteria and fungi susceptibility of microorganisms. Next, microorganisms colonies and control group were counted by calculating the number of microorganisms per 1 ml of solution (CFU/ml). Total of 12 samples were prepared for each concentration and a control group.

### **Mechanical properties**

For Three-Point Bending Test (TPB) samples were prepared according to PN-EN 4049:2003 specification. Zwick/Roell Z020 machine (Zwick Roell Group, Germany) was used to perform the test at crosshead speed of 0.75 mm/min. The total of 11 samples was prepared for each study and control.

For Diametral Tensile Strength test (DTS) samples were prepared according to ANSI ADA no.55 specification. Zwick/Roell Z020 (Zwick Roell Group, Germany) machine was used to perform the test at crosshead speed of 0.5 mm/min. The total of 11 samples was prepared for each study and control.

For Hardness (HV1) test samples for Vicker's Hardness test were prepared according to PN- EN ISO 6507-1 specification. The microhardness tester Zwick/ Roell Zhµ (Zwick Roell, group, Germany) was used to perform the test. The intender load amounted up to 1kg and applied time - 10 s (HV1). Seven samples were used for the study. Each sample was tested 3 times.

Single factor analysis was conducted to analyse all results. Both in antibacterial and mechanical tests results were statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Antimicrobial test results**

In stage I the biggest inhibition zone against *S. mutans* was recorded for cinnamon oil (39.17±1.4 mm). There was no inhibition zone for anise and lime oil against *S. mutans*. The biggest inhibition zones against *L. acidophilus* were recorded for cinnamon oil thyme oil (39.83±1.09 mm) and for cinnamon oil (39.64±0.99 mm) and the smallest - for rosemary oil (9.05±0.44 mm). The biggest inhibition zones against *C. albicans* was recorded for cinnamon oil (54.87±0.78 mm) and the smallest - for lime oil (11.67±0.78 mm).



In stage II cinnamon oil was used. It was observed that the lowest number of microorganisms colonies was recorded for an oil concentration of 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and the biggest for the control group for *S. mutans* and *C. albicans*. The lowest number of microorganisms colonies was recorded for oil concentration of 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and the biggest - for control group for *L. acidophilus*. Results were statistically significant among control group and all tested groups and between group of oil concentration of 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  vs 2 $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and 5 $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and between group 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  vs 5 $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

### ***Mechanical tests results***

Composite material was modified with cinnamon essential oil in 3 concentrations for all mechanical tests.

The highest TPB values were observed for oil concentration of 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  (65.25 $\pm$ 12.23 MPa). The lowest values were observed for oil concentration of 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  (43.93 $\pm$ 18.45 MPa). The oil concentration of 1 $\mu\text{l}/2\text{ g}$  exhibited statistically higher values than control group and other groups: 2 $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

The statistical analysis showed that the highest DTS values were observed in control group (36.31 $\pm$ 3.58 MPa). The lowest values were observed in group 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  (31.36 $\pm$ 5.49 MPa). The control group and a group with oil concentration of 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  exhibited statistically higher values than groups with oil concentration of 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

The highest HV1 values were found in control group (34.95 $\pm$ 3.32). The lowest values were observed for oil concentration of 5 $\mu\text{l}/2\text{g}$  (23.86 $\pm$ 4.54). The control group gained significantly higher values than other groups. Moreover, the oil concentration of 5  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  exhibited statistically lower values than concentration 1  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  and 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$ .

### **Conclusions**

1. Among tested essential oils most of them show antimicrobial properties against *S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans*. The anise and lime oil did not show inhibitory properties against *S. mutans*.
2. Cinnamon oil showed the strongest antimicrobial properties against tested strains.
3. Composite material modified with cinnamon essential oil (concentration of 2  $\mu\text{l}/2\text{ g}$  ) showed stronger antimicrobial properties against *S.mutans*, *L.acidophilus*, *C.albicans* than commercial composite material. At the same time mechanical properties of experimental composite were preserved.