

Aplicação de extratos vegetais na eliminação do biofilme por *Candida albicans* em resinas dentárias

Application of plant extracts in the elimination of biofilm by *Candida albicans* in dental resins

Maria Elvira Sica Cruzeiro¹, Daiane Einhardt Blank^{2*}, Rogério Freitag¹, Luciana Rezende Pinto¹, Mário Carlos Araújo Meireles¹, Marlete Brum Cleff¹

RESUMO

Candida albicans, agente da Candidose oral, principal espécie envolvida com o biofilme. Pacientes usuários de próteses totais desenvolvem patologias associadas ao biofilme. Assim, o objetivo do trabalho foi quantificar o biofilme residual de *C. albicans* em material de próteses após exposição à diferentes extratos de *Rosmarinus officinalis*. Para confecção dos corpos de prova foi usada resina acrílica polimerizada em microondas. Após a polimerização da resina, os corpos de prova foram polidos e esterilizados com óxido de etileno. Posteriormente, foi induzida a formação do biofilme, os corpos de prova foram expostos à extratos de *R. officinalis* e após foi realizada a quantificação do biofilme. A loção do óleo essencial de *R. officinalis* a 24% foi a mais efetiva para remover o biofilme, seguida do óleo essencial em carbopol, não mostrando diferença estatística entre esses e em relação à nistatina. Conclui-se que a loção do óleo essencial de *R. officinalis* à 24% pode ser o tratamento alternativo para erradicação do biofilme.

Palavras-chave: Biofilme, *C.albicans*, Extratos, *R. officinallis*.

ABSTRACT

Candida albicans, agent of oral Candidosis, main species involved with biofilm. Patients using total prostheses develop pathologies associated with biofilm. Thus, the objective of this work was to quantify the residual biofilm of *C. albicans* in prosthesis material after exposure to different extracts of *Rosmarinus officinalis*. To make the specimens, a polymerized acrylic resin was used in a microwave. After polymerization of the resin, the specimens were polished and sterilized with ethylene oxide. Subsequently, the formation of the biofilm was induced, the specimens were exposed to extracts of *R. officinalis* and

¹Universidade Federal de Pelotas - UFPel

²Universidade Federal de Viçosa – UFV

*E-mail: daiane.blank@ufv.br

after the quantification of the biofilm was performed. The essential oil lotion of *R. officinalis* at 24% was the most effective to remove the biofilm, followed by essential oil in carbopol, showing no statistical difference between these and in relation to nystatin. It is concluded that the essential oil lotion of *R. officinalis* at 24% may be the alternative treatment for biofilm eradication.

Keywords: Biofilm, *C.albicans*, extracts, *R. officinalis*

INTRODUÇÃO

Os biofilmes são estruturas biológicas com um elevado grau de organização, onde os microorganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície úmida, seja ela biótica ou abiótica, por exemplo em condutas de água, na pele e mucosas, nos dentes, em próteses e nas indústrias (RAMOS et al.,1999).

O biofilme por leveduras vem sendo tratado com os antifúngicos tradicionais, sendo as alinaminas e os azóis os fármacos de eleição, apesar de muitas vezes ocorrer resistência à estes medicamentos (DONLAN, 2001; DONLAN e COSTERTON, 2002; KUHN et al., 2002; CARDOSO, 2004; PERCIVAL, et al. 2011). Por outro lado, alternativas vem sendo estudadas como a desinfecção por micro - ondas (Silva et al. (2006), uso de substâncias higienizadoras (Jardim et al. (1998); Vieira et al. (2010) soluções desinfetantes (Ferreira et al. (2009) e mais modernamente a chamada terapia fotodinâmica (BEVILACQUA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2011). Entretanto, poucos estudos tem avaliado a capacidade de extratos vegetais, quanto a capacidade de eliminar o biofilme formado. Carreto et al. (2007), avaliaram o efeito do chá de tomilho (*Thymus vulgaris* Linn.) sobre a aderência de *C. albicans* em resinas acrílicas, detectando o efeito anti aderência da levedura sobre a resina acrílica. Taweechaisupapong et al. (2006), usaram a mesma linha de pesquisa com *Streblus asper* demonstrando também, a diminuição da habilidade da levedura de aderir-se à resinas. Alves et al. (2009), obteve resultados promissores quando avaliaram in vitro, a atividade antimicrobiana, antifúngica e antiaderente da aroeira-do-sertão, malva e goiabeira sobre microrganismos do biofilme dental e candidose oral. Por outro lado, Reis et al. (2011), testou as atividades inibitórias do extrato da folha de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e da folha de goiabeira

(*Psidium guajava* L) em *Candida albicans*, sendo que nenhum destes inibiu a formação do biofilme nas concentrações utilizadas.

O alecrim pertence à família Lamiaceae, e possui propriedades como antisséptico para as vias aéreas e cavidade bucal, cicatrizante, antifúngico e antibacteriano, sendo que grande parte dos trabalhos tem utilizado o óleo essencial, devido a atividade antimicrobiana demonstrada (LORENZI & MATOS, 2002; PORTE & GODOY, 2001; ANGIONI et al., 2004; SANTOYO et al., 2005; CELIKTAS et al., 2007; LUQMAN et al., 2007; BERNARDES et al., 2010; HUSSAIN et al., 2010). Trabalhos utilizando outras formas de extratos são escassos, sendo encontradas poucas informações acerca da atividade anticandida dos extratos aquosos e etanólicos de alecrim (ARAUJO, 2010). Especificamente em relação a eliminação do biofilme com este tipo de extrato, não foram encontrados na literatura nenhum trabalho, sendo o estudo pioneiro neste sentido. Assim, objetivo do trabalho foi quantificar o biofilme residual de *Candida albicans* em material de próteses após exposição à diferentes extratos de *Rosmarinus officinalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos extratos de Alecrim

O alecrim (*R. officinalis*), foi obtido de distribuidor com certificado de qualidade. Após, foi encaminhado ao Centro de Ciências Químicas e Farmacêuticas (CCQF – Ufpe) para obtenção do óleo essencial e extrato hidroalcoólico. Para o óleo essencial utilizou-se 100 g da planta e 1,5 L de água destilada estéril que foram submetidos à hidrodestilação em Clevenger, após foi armazenado sob refrigeração (Farmacopéia Brasileira IV). Para os extratos hidroalcoólicos utilizou-se 20 g da planta com 200 mL de solução etanólica a 80%, por 1 hora à 40 °C em banho de óleo, sendo então filtrado e repetido por duas vezes juntando-se os filtrados, e levado ao rotaevaporador, obtendo-se o extrato.

Confecção dos Corpos de prova

Para confecção dos corpos de prova, blocos de silicona de condensação Zetalabor (Zhermack) (1cm x 1cm x 0,5cm) foram incluídos em mufla para polimerização em microondas, utilizando gesso pedra, para posteriormente serem preenchidos com resina acrílica termopolimerizada em microondas manipulada segundo as especificações do fabricante. Para a polimerização da resina utilizou-se forno de microondas com frequência de 60 Hz e potência máxima de 1600 Watts, com o seguinte ciclo de polimerização: 300W por 3 minutos, 100W na potência zero por 4 minutos, e 600W por

3 minutos. Após o resfriamento da mufla, os corpos de prova foram demuflados e os excessos de resina acrílica removidos com broca de tungstênio. Posteriormente, foram lixados com lixa d'água de granulação 80 em politriz circular metalográfica manual em baixa velocidade e sob refrigeração. Em seguida, os corpos de prova foram imersos em água destilada autoclavada em temperatura ambiente por 1 semana, para liberação dos monômeros superficiais Oliveira et al. (2003) e encaminhados para esterilização em óxido de etileno.

Inóculo de *Candida albicans*

As colônias de *C. albicans* utilizadas no experimento foram provenientes do Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. (CIP/FOB - USP). O inóculo foi preparado a partir de suspensões congeladas, semeadas em placas de petri contendo meio YEPD ágar e incubadas à 30 °C durante 36 horas. Para a obtenção da pré-cultura, uma colônia de *C. albicans* foi ressuspensa em 50 mL de caldo YEPD a 30 °C, sob agitação de 180 rpm overnight. Após esta etapa, as células de *C. albicans* foram lavadas e centrifugadas, e ressuspensas em 1mL de PBS, sendo ajustadas com PBS em uma concentração final igual a $1,0 \times 10^7$ /MI (CHANDRA et al., 2001b).

Desenvolvimento de biofilme

Os corpos de prova foram inoculados com 1,5 mL da suspensão de *C albicans* contendo 10^7 cels/mL e incubados a 37 °C sob agitação de 75 rpm, durante 90 minutos, para a fase de adesão. Posteriormente, o inóculo foi lavado com PBS para remoção das células não aderidas e foi acrescentado 1,5 mL de meio RPMI-1640, acrescido de MOPS, incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação, por 48 horas, para a formação do biofilme. (CHANDRA et al., 2001b). Após este período, os corpos de prova foram lavados suavemente com PBS e submetidos aos tratamentos conforme os grupos experimentais.

Grupos experimentais

Após a produção do biofilme, os corpos de prova foram divididos em grupos experimentais e submetidos aos tratamentos durante 48 horas, conforme distribuição na Tabela 1.

Tabela 1 – Quadro demonstrativo da distribuição dos grupos experimentais conforme tratamento utilizado para tratamento do biofilme nos corpos de prova

Grupos experimentais	Tratamentos
G1	Não tratados
G2	Tratados nistatina 0,5%
G3	Tratados loção do óleo de <i>Rosmarinus Officinalis</i> 24%
G4	Tratados óleo essencial 21% em carbopol
G5	Tratados extrato hidroalcoólico de <i>R. Officinalis</i> 20%
G6	Tratados Carbopol 3%

Ensaio de quantificação do biofilme

Decorridas 48 horas, os corpos de prova foram lavados suavemente com PBS morno para retirar o tratamento e iniciar o ensaio de quantificação do biofilme. Para cada placa de 24 poços de corpos de prova tratados, eram feitos dois corpos de prova sem tratamento e sem inoculação, para teste colorimétrico apenas (branco). O biofilme foi fixado com metanol gelado à 100% por 15 minutos. Posteriormente, o excesso de metanol foi aspirado e os corpos de prova corados com 1,5 mL de solução de cristal violeta 0,1% e incubados a 37 °C por 5 minutos sob agitação de 75 rpm, para pigmentação do biofilme. Para remoção do excesso de corante, foram realizadas três lavagens com PBS, e após o corante foi removido com 1,5 mL de etanol 95% incubados à 37 °C, por 5 minutos, sob agitação de 75 rpm. Para cada amostra de biofilme, uma alíquota de 100 µL da solução descorada foi diluída 1:10 e submetida a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm para leitura da absorbância.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos pela média \pm desvio padrão (SD) dos resultados obtidos para cada grupo de tratamento e foram submetidos ao teste ANOVA seguido de teste de Tukey ($p= 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura espectrofotométrica para quantificação do biofilme no material de prótese, observou-se diferenças estatísticas entre os tratamentos, sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Leitura espectrométrica da produção do biofilme por *Candida albicans*, após a utilização dos diferentes grupos de tratamento e percentual da redução do biofilme

Tratamentos	Absorbância	Redução na quantificação (%)
G1	4,1185 ^c	0
G2	1,3042 ^b	68,34
G3	1,5623 ^b	62,07
G4	16,724 ^a	0
G5	15,319 ^a	0
G6	14,682 ^a	0

*a, b, c: Letras diferentes, demonstram diferença estatística significativa (p=0,05)

G1 Não tratado, G2 Nistatina 0,5%, G3 Loção do óleo essencial de *R. Officinalis* 24%, G4 Óleo Essencial 21% em Carbopol, G5 Extrato Hidroalcoólico de *R. officinalis* 20% G6 Carbopol 3%

De acordo com os resultados, pode-se observar, que a loção a 24% de óleo essencial de alecrim (G3) foi a eficaz na eliminação do biofilme pré - formado, reduzindo-o em 62,07% seguido da nistatina (G2) que eliminou-o em 68,34%. Os resultados para a nistatina eram esperados, pois este é considerado o antifúngico de eleição para os quadros clínicos de estomatite por *Candida* atuando também no controle do biofilme bucal. Já o óleo essencial 24% em carbopol e o extrato hidroalcoólico 21% não mostraram eficácia na eliminação do biofilme apresentando leitura semelhante ao carbopol (controle negativo), e, não diferindo estatisticamente deste. Os resultados para estes grupos, (G4, G5, G6) podem ter ocorrido devido a incapacidade destas formulações em penetrar no biofilme pré-formado, formando ainda uma camada intermediária que pode ter atuado como substrato, permitindo uma maior aderência entre as células, aumentando a quantidade de biofilme presente nestes corpos de prova. O carbopol tem sido utilizado como veículo em medicamentos de uso odontológico, não tendo ação no biofilme por *C. albicans* (OLIVEIRA et al., 2010). Os resultados observados no G1 já eram esperados, pois com relação à adesão de *Candida* spp. às superfícies de próteses dentárias, vários trabalhos tem sido desenvolvidos (Busscher et al. (2010) demonstrando que a adesão também depende do tipo de material empregado (NEVZATOGLU et al., 2007).

Os resultados dos tratamentos demonstraram que nos grupos nistatina (G2) e loção de óleo essencial de *R. officinalis* 24% (G4) a leitura espectrofotométrica foi em média de 1,3042 e 1,5623 respectivamente demonstrando diferença estatística dos outros tratamentos conforme mostra a Figura 1.

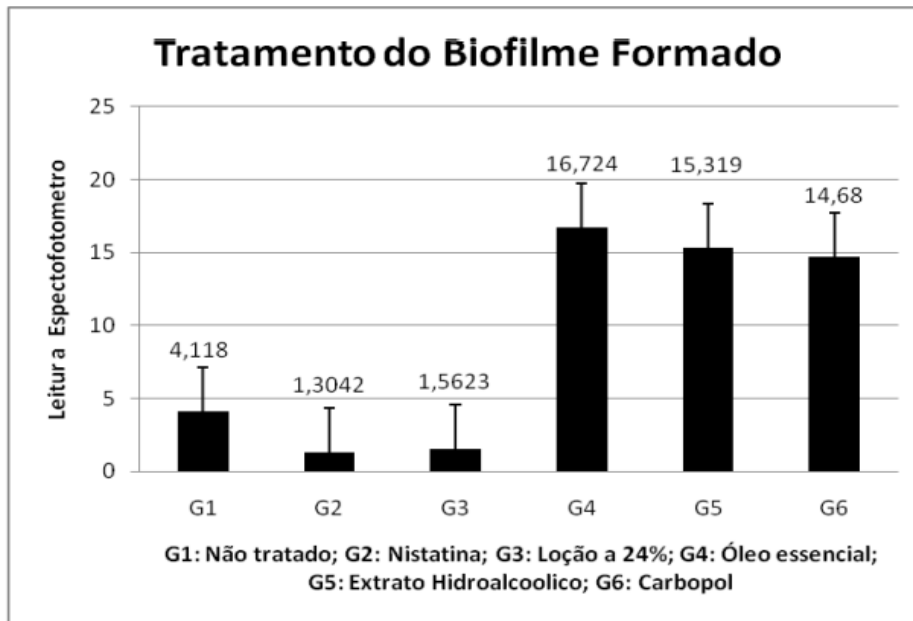


Figura 1 - Representação gráfica dos resultados dos diferentes tratamentos e grupos controle, utilizados na eliminação do biofilme por *Candida albicans* em material de prótese.

O uso de extratos vegetais tem despertado interesse da comunidade científica, que busca produtos com eficácia comprovada e efeitos adversos mínimos, além de custos reduzidos. Entretanto, avaliação do uso de extratos de *R. officinalis* na eliminação do biofilme dentário não foram encontrados na literatura, demonstrando a importância do estudo. Entretanto, Chifiriuc et al. (2012), combinaram as propriedades de nanopartículas (20nm) com óleo essencial do *R. officinalis*, demonstrando forte inibição da capacidade de adesão e no desenvolvimento de biofilme por *C. albicans* e *C. tropicalis* em catéteres. Alguns autores tem trabalhado com biofilme utilizando outros extratos de plantas. Alves et al. (2009) demonstraram que os extratos hidroalcoólicos da aroeira-do-sertão, goiabeira e malva apresentaram *in vitro* potencial atividade antimicrobiana e antiaderente sobre os microrganismos formadores no biofilme dental. Enquanto Reis et al. (2011) avaliando os extratos das folhas de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e goiabeira (*Psidium guajava* L), demonstraram que estes não foram efetivos na inibição da formação do biofilme por *C. albicans*. Segundo a literatura o tratamento após adaptação e formação do biofilme, deve ser realizado utilizando-se fármacos antimicrobianos como antissépticos, antibacterianos ou antifúngicos. O biofilme por leveduras vem sendo tratado com os antifúngicos tradicionais apesar de muitas vezes ocorrer resistência à estes medicamentos (DONLAN, 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002; KUHN et al., 2002; PERCIVAL et al., 2011). A possibilidade do uso de extratos vegetais, apresenta inúmeras vantagens,

principalmente tratando-se de produtos naturais com mecanismo de ação desconhecido aos patógenos, o que dificulta a resistência e abre a possibilidade de opção terapêutica para estes quadros (ANDRADE, 2008).

CONCLUSÃO

A loção a 24% de *Rosmarinus officinalis* foi capaz de eliminar o biofilme pré-formado por *C. albicans* em material de prótese dentária, podendo vir a ser uma opção para o controle do biofilme e, desta forma da candidose oral.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

REFERÊNCIAS

ALVES, P.; QUEIROZ, L. M.; PEREIRA, J.; PEREIRA, M. S. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, n.2, p.222-224, 2009.

ANDRADE, S. F. Manual de terapêutica veterinária. Editora Roca, 2008.

Angioni, A.; Barra, A.; Cereti, E; Barile, D.; Coisson, J. D.; Arlorio, M.; Dessi, S.; Coroneo, V.; Cabras, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal Agricultural and Food Chemistry, v.52, p.3530-3535, 2004.

ARAÚJO, N. R. R. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, como requisito para obtenção do título de Mestre do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. 2010.

BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; SOUZA, M. G.; SILVA, L.; FILHO, A. A.; MARTINS, C. H.; CROTTI, A. E.; PAULETTI, P. M.; GROPPA, M.;

CUNHA, W. R. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chemistry & Biodiversity*, v.7, n.7, p.1835-40, 2010.

BEVILACQUA, I. M.; BRUGNERA, J. R. A.; NICOLAU, R. A. Ação do Laser de Baixa potência associado à substâncias fotoativadoras na redução de *Candidas* em meio bucal (Revisão Da Literatura–). IX Encontro Latino Americano De Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano De Pós-Graduação; Universidade Do Vale Do Paraíba. 2007.

BUSSCHER, H. J.; RINASTITI, M.; SISWOMIHARDJO, W.; VAN DER MEI, H. C. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research*, v.89, n.7, p.657-65, 2010.

CARDOSO, B. C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho. 2004.

CARRETTO, C. de F. P.; NAVAS, E. A. F. de A.; PARADELLA, T. C.; OLIVEIRA, L.D. de; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. *Revista de Odontologia da UNESP*, 36(3): 281-286 © 2007 - ISSN 1807-2577, 2007.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, n.100, p.553-559, 2007.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, D. M. A. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen. *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of bacteriology*, V. 183, n.18, p.5385-5394, 2001.

CHIFIRIUC, C.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A.; SAVIUC, C.; LAZAR, V.; ANDRONESCU, E. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Research Letters*, Vol.7(1), pp.1-7, 2012.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Disease*, 33(8): 1387-92, 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology*, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

FERREIRA, M. A. F.; PEREIRA-CENCI, T.; VASCONCELOS, L. M. R.; CUNHA, R.; RODRIGUES-GARCIA, M.; DEL BEL CURRY, A. A. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clinical Oral Investigations*, v.13, n.2, p.237-242, 2009.

FONSECA, J. Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares. Tese para obtenção do título de Mestre. Universidade de Lisboa, Portugal, 2010.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P. S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, n.4, p.1070-8, 2010.

Jardim Júnior, E. G.; Pedrini, D.; Xavier, F. A.; Jardim, O. S. Eficácia do Listerine sobre a placa. *Revista Gaúcha Odontológica*, 46: 70-78, 1998.

KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M. A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (1): 506-508, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum (São Paulo) 2002, p.261.

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G. R.; DAROKAR, M. P.; KALRA, A.; KHANUJA, S. P. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, v.13, n.5, p.54-9, 2007.

NEVZATOĞLU, E. U.; ÖZCAN, M.; KULAK-OZKAN, Y.; KADIR, Tanju. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clinical Oral Investigations*, 11(3):231-236, 2007 February.

OLIVEIRA, V. M.; LÉON, B. L.; DEL BEL CURY, A. A.; CONSANI, S. Influence of number and position of flasks in the monomer release, Knoop hardness and porosity of a microwave-cured acrylic resin. *Journal of Prosthetic Oral Rehabilitation*, 30:1104-1108, 2003.

PERCIVAL, S. L.; HILL, K. E.; WILLIAMS, D. W.; HOOPER, S. J.; THOMAS, D. W.; COSTERTON, J. W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound repair and regeneration*, 20(5):647-57, 2012.

PEREIRA, C. V. Ação das amostras de *Streptococcusmutans* e *Streptococcussobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase dentária – estudo in vitro. *Revista Passo Fundo*, v.4, p.33-39, 1999.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.19, n.2, p.193-210, 2001.

RAMOS, I. C.; VASCONCELOS, L. S.; LIMA, M. C.; FIGUEIREDO, R. Q. Candidose Bucal em pacientes HIV- positivos. *Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica*, v.3, n.13, p.59-61, 1999.

REIS, N.; LELIS, T.; MENDONÇA, A.; CHAVASCO, J. K. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans*. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v.9, n.2, p.337-343, 2011.

Ribeiro, D. G.; Pavarina, A. C.; Dovigo, L. N.; Mima, E. G. de O.; Machado, A. L.; Bagnato, V. S.; Vergani, C. E. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation: Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers in Medical Science*, 26(2), 2011.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, n.68, p.790-795, 2005.

SILVA, M. M.; VERGANI, C. E.; GIAMPAOLO, E. T.; NEPPELENBROEK, K. H.; SPOLIDORIO, D. M.; MACHADO, A. L. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *International Journal of Prosthodontics*, 19(3) 288-93, 2006.

TAWEECHAI SUPAPONG, S.; KLANRIT, P.; SINGHARA, S.; PITIPHAT, W.; WONGKHAMC, S. Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 414–417, 2006.

VIEIRA, A. P.; SENNA, P. M.; SILVA, W. J.; DEL BEL CURY, A. A. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing *Candida* spp. biofilm recolonization on liner surface. *Brazilian Oral Research*, 24(3): 342, 2010.

Recebido em: 23/07/2022

Aprovado em: 25/08/2022

Publicado em: 28/08/2022