



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**MARCELLA MARIA ROCHA LIMA**

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum carnosum* EM  
BIOFILME DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* SOBRE  
ESPÉCIMES RESINA ACRÍLICA**

**FORTALEZA**

**2019**

MARCELLA MARIA ROCHA LIMA

EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum carnosum* EM  
BIOFILME DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* SOBRE  
ESPÉCIMES RESINA ACRÍLICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L699e Lima, Marcella Maria.  
EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum carnosum* EM BIOFILME DUO-  
ESPÉCIE DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* SOBRE ESPÉCIMES RESINA ACRÍLICA /  
Marcella Maria Lima. – 2019.  
36 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e  
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça.
1. Antibacterianos, Antifúngicos, Fitoterápicos. I. Título.
- CDD 617.6
-

MARCELLA MARIA ROCHA LIMA

EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum carnosum* EM  
BIOFILME DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* SOBRE  
ESPÉCIMES DE RESINA ACRÍLICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bruno Rocha da Silva  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus, que é o Senhor de tudo. À minha família, que me apoiou em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, por meio de seu Magnífico Reitor Henry de Holanda Campos e de seu vice-reitor Custódio Luís Silva de Almeida.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de sua diretora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, e na de sua vice-diretora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Karina Bezerra Pinheiro.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Ceará, Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia, e à sua vice-coordenadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Sá Roriz Fonteles.

À Coordenadora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Karine Macedo Teixeira, e à sua vice-coordenadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alynne Vieira de Menezes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante o período do mestrado.

Aos funcionários da coordenação do PPGO, Joana Karla de Assis Pinheiro e Rafael Maia Reis, pela dedicação e disponibilidade em ajudar no que for preciso.

A todos os funcionários e servidores do Curso de Odontologia da UFC, por sempre estarem dispostos a ajudar.

À banca, composta pelos professores Bruno Rocha da Silva e Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, por terem aceitado o convite, pelo tempo dedicado e pelas considerações.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, o Criador de todas as coisas, que sempre caminha comigo, que está sempre me ajudando, dando-me forças e me protegendo de todo mal. Sou grata por me permitir vencer mais essa etapa em minha vida.

Aos meus pais, **João Batista Farias Lima e Renilvane Maria Rocha Lima**, por me ensinarem que nada se conquista com facilidade, por sempre terem feito o possível para que eu tivesse uma boa formação e por serem meu maior exemplo.

Aos meus irmãos **Targino Onildo Lima Neto e João Renato Rocha Lima** por terem feito tudo por mim, inclusive aguentado os meus dias de estresse.

À minha família, em especial meus sobrinhos **Marcos Henrique Melo Vieira da Silva, Manuela Melo Vieira da Silva, Sophie Ventilare de Oliveira Lima e Laís Lima Tomaz**, que são minhas alegrias diárias.

Ao meu namorado, **Arthur Dantas de Araújo**, pela paciência e companheirismo.

Ao meu tão querido Orientador, **Prof. Dr. Juliano Sartori Mendoca**, por todo apoio, conhecimento transmitido, hospitalidade, confiança, paciência, amizade, pela oportunidade que me foi dada e, principalmente, pela tranquilidade transmitida. O senhor é uma inspiração, tanto como pesquisador e professor, quanto como pessoa.

À amiga **Bianca Palhano Toscano Leite** por ter me incentivado e ajudado em vários momentos desta caminhada, inclusive durante as madrugadas, mas o mais importante, por sempre me lembrar o quanto devemos confiar em Deus e acreditar que Ele está sempre cuidando de tudo.

À amiga **Talita Arrais Daniel Mendes** por todo apoio tanto no mestrado quanto nas minhas inquietações da vida, por nunca medir esforços para ajudar e estar presente em tudo.

À amiga **Maria Tayara Marques Freitas** por sempre ser uma pessoa solícita e por ter me ajudado tanto a enfrentar feriados e fins de semana no laboratório, deixando meus dias mais alegres e leves.

À amiga **Ana Catarina Martins Reis** por ter me ensinado tanto na microbiologia e com todo o carinho e atenção do mundo estar disponível para me ajudar

À amiga **Ernanda Maria Sales de Araujo** pela ajuda durante o experimento e pela amizade conquistada desde a época da graduação.

## RESUMO

Biofilmes são comunidades complexas, podendo envolver diferentes espécies de microrganismos, como bactérias e fungos. Esses microrganismos podem ser encontrados em Próteses Totais Orais (PTs). O Biofilme pode levar à estomatite protética, que é uma condição caracterizada por uma inflamação generalizada na mucosa coberta pela superfície da prótese. Meios de limpeza são indicados para evitar a formação de biofilme oral, os mais comuns são os métodos químicos. No entanto, esses compostos podem causar irritações na mucosa ou, ainda, afetar as propriedades físicas das próteses. Há interesse em medicamentos à base de plantas medicinais que possuem atividade antimicrobiana e que sejam biocompatíveis aos tecidos humanos, como o óleo essencial de *Ocimum carnosum* (OEOC), conhecido popularmente como Alfavaca-do-mato. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano, através do uso de uma formulação contendo óleo essencial de *Ocimum carnosum* em biofilme duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* formado sobre espécimes de resina acrílica. O OEOC foi coletado a partir de folhas secas, sendo extraído pela técnica de arraste a vapor. A concentração da formulação foi anteriormente determinada pela CIM (Concentração Inibitória Mínima). Para a determinação da CIM, o OEOC foi testado em diluições de 32% a 0,015% em uma placa de 96 poços, contendo 100 µl de meio Brain Heart Infusion - BHI, 5 µl de cada cepa de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* e 100 µl da formulação testada. Os grupos controles foram testados tendo como controle positivo o diluente da formulação e como controle negativo o digluconato de clorexidina a 0,12%. Foi obtida como resultado uma concentração de 4% da formulação para uso. A análise microbiológica foi realizada utilizando as mesmas cepas da CIM que também passaram por ativação e inoculação, utilizando-se Caldo Brain Heart Infusion (BHI) para *C. albicans* e BHI suplementado com glicose para *S. mutans*. As cepas foram ajustadas na escala de McFarland. Os espécimes confeccionados com resina acrílica autopolimerizável (10 mm de diâmetro x 5 mm de altura) foram distribuídos aleatoriamente para formação de biofilme, dividido em 3 triplicatas técnicas e 3 triplicatas biológicas: 4% de OEOC; 0,12% de Digluconato de clorexidina (CLX) e diluente da formulação (DIL), sendo cada grupo deixado por 1 hora e 3 horas de imersão, numa placa de 24 poços, acrescidos de BHI caldo suplementado com sacarose e 18,75 µl de cada cepa. Os espécimes foram lavados com solução salina 0,89% após 24 horas e houve troca de meio. Após 24 horas de crescimento do biofilme, os espécimes foram transferidos para tubos de microcentrífuga, sonicados, diluídos até a concentração de  $10^{-7}$  e semeados em placas de petri com 10 µl cada gota. Após o período de incubação na estufa, a  $37 \pm 1$  °C, 5% de CO<sub>2</sub> de 48 horas, os



resultados foram obtidos em unidades formadoras de colônia (UFC) por ml/mg, utilizando os valores obtidos através do peso seco do biofilme formado no final do experimento. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido de ANOVA de dois fatores e de um pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa SigmaPlot 11.0. Os resultados mostraram que, sobre a cepa de *C. albicans*, o OEOC demonstrou ser estatisticamente semelhante à CLX ( $p > 0,05$ ) para o intervalo de 1 hora de imersão, e para o *S. mutans*, a droga mostrou ser estatisticamente superior ( $p > 0,05$ ) quando comparado à eficácia dos grupos de CLX e do diluente da formulação, para o intervalo de 3 horas. Assim, constata-se que o OEOC tem efeito antimicrobiano sobre a *Candida albicans* e o *Streptococcus mutans*, podendo, através de mais estudos, ser viável na utilização de desinfecção de próteses.

**Palavras-chave:** Biofilme dentário. Antibacterianos. Antifúngicos. Fitoterápicos.

## ABSTRACT

Biofilms are complex communities that may involve different species of microorganisms, such as bacteria and fungi. These microorganisms can be found in Oral Total Prosthesis (PTs). Biofilm can lead to prosthetic stomatitis, which is a condition characterized by widespread inflammation of the mucosa covered by the prosthesis surface. Cleaning means are indicated to prevent the formation of oral biofilm, the most common are chemical methods. However, these compounds may cause mucosal irritation or affect the physical properties of prosthesis. There is interest in herbal medicines that have antimicrobial activity and are biocompatible to human tissues, such as *Ocimum carnosum* essential oil (OEOC), popularly known as Alfavaca-domato. The objective of the study was to evaluate the antimicrobial effect by using a formulation containing *Ocimum carnosum* essential oil in biofilm of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* duo formed on acrylic resin specimens. The OEOC was collected from dried leaves and extracted by the steam drag technique. The concentration of the formulation was previously determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). For MIC determination, OEOC was tested at 32% to 0.015% dilutions in a 96-well plate containing 100  $\mu$ l Brain Heart Infusion - BHI medium, 5  $\mu$ l of each strain of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* and 100  $\mu$ l of the formulation tested. Control groups were tested with the formulation diluent as positive control and 0.12% chlorhexidine digluconate as negative control. A concentration of 4% of the formulation for use was obtained as a result. Microbiological analysis was performed using the same MIC strains that also underwent activation and inoculation using *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) for *C. albicans* and BHI supplemented with glucose for *S. mutans*. The strains were adjusted on the McFarland scale. Specimens made with self-curing acrylic resin (10 mm diameter x 5 mm high) were randomly assigned to biofilm formation, divided into 3 technical triplicates and 3 biological triplicates: 4% OEOC; 0.12% Chlorhexidine Digluconate (CLX) and Formulation Diluent (DIL), each group being left for 1 hour and 3 hours soaking in a 24-well plate plus BHI sucrose supplemented broth and 18.75  $\mu$ l of each strain. The specimens were washed with 0.89% saline solution after 24 hours and the medium was changed. After 24 hours of biofilm growth, the specimens were transferred to sonicated microfuge tubes, diluted to a concentration of  $10^{-7}$  and seeded in 10  $\mu$ l petri dishes each drop. After incubation in the greenhouse at  $37 \pm 1$  °C, 5% CO<sub>2</sub> of 48 hours, the results were obtained in colony forming units (CFU) per ml / mg, using the values obtained through the dry weight of the biofilm formed at the end of the experiment. Data were tabulated and subjected to the Shapiro Wilk normality

test, followed by two-way ANOVA and a Tukey post-test ( $p < 0.05$ ) using the SigmaPlot 11.0 program. The results showed that, for *C. albicans* strain, the OEOC was statistically similar to CLX ( $p > 0.05$ ) for the 1 hour immersion interval, and for *S. mutans*, the drug was statistically superior. ( $p > 0.05$ ) when compared to the efficacy of the CLX groups and formulation diluent for the 3 hour interval. Thus, it appears that OEOC has antimicrobial effect on *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* and may, through further studies, be viable in the use of prosthesis disinfection.

Keywords: Dental biofilm. Antibacterial. Antifungals. Herbal medicines.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

OEOC	Óleo essencial de <i>Ocimum carnosum</i>
DIL	Diluyente da formulação
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
CLX	Digluconato de Clorexidina
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
EL	Extrato de Levedura
EUA	Estados Unidos da América
H <sub>2</sub> O	Água
KCl	Cloreto de Potássio
KPO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PH	Potencial Hidrogeniônico
TSB	Tryptic Soy Broth
UA159	Sorotipo C de <i>Streptococcus mutans</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

**LISTA DE SÍMBOLOS**

%	Porcentagem
g	Gramma
mL	Mililitro
h	Horas
°C	Grau Celsius
L	Litros
mg	Miligrama
min	Minuto
μL	Microlitro
®	Marca registrada
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
p	Significância estatística
<	Menor que
≤	Menor ou igual
μg	Micrograma

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3 CAPÍTULO:"AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum carnosum</i> EM BIOFILME DUO-ESPÉCIE" .....</b>	<b>17</b>
<b>4 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Apesar dos avanços da saúde pública, o Brasil apresenta, ainda, 11% da sua população sem nenhum dente, o que corresponde a um montante de 16 milhões de pessoas. Além disso, 23% da população já perdeu um ou mais dentes (PNS/IBGE, 2015). Isso pode se decorrer pelo fato de no Brasil o envelhecimento populacional ter sido particularmente rápido, com os idosos aumentando de 11% da população economicamente ativa em 2005 para 49% em 2050 (World Bank, 2011).

Para reabilitação de tecidos dentários e periodontais perdidos, a opção mais comum é reabilitar com próteses removíveis (KAWASAKI et al., 2016). O uso de prótese dentária é indicado para a recuperação da capacidade mastigatória, para a melhora do aspecto estético e de fonação dos indivíduos acometidos pela perda dental, impactando na qualidade de vida dos mesmos (MONTERO et al., 2013). Entretanto, o uso de próteses removíveis pode levar à mudança da microflora e permitir a instalação de infecções microbianas (RAMAGE et al., 2004).

A prevalência de lesões mucosas orais (OMLs) geralmente é relatada como maior nos usuários de prótese dentária do que nos que não fazem seu uso devido as próteses fornecerem proteção e nichos de colonização para uma variedade de microrganismos por causa das heterogeneidades na sua superfície, sendo mais observadas em portadores de próteses dentárias totais (PTs) do que nos portadores de próteses parciais. Isso pode se dar devido à área da mucosa oral coberta por uma dentadura completa ser maior do que a coberta por uma dentadura parcial e, portanto, pode aumentar o risco de lesões (JAINKITTIVONG et al., 2010).

A principal lesão que acomete os portadores de próteses removíveis é a estomatite protética, que é uma inflamação generalizada da mucosa coberta pela prótese (HANNAH et al., 2017). Foi relatado que ela afeta 15-70% dos usuários de próteses (GENDREAU et al., 2011) e é uma forma de candidíase oral associada a um aumento quantitativo de leveduras na mucosa e na superfície da prótese (HILGERT et al., 2016).

O biofilme localizado sobre essas próteses é potencialmente patogênico, expondo aos indivíduos à possibilidade de infecções sistêmicas graves. A maioria das próteses são formadas de resina acrílica. A adesão a estes materiais depende das propriedades da superfície das células microbianas que irão aderir e formar o biofilme, criando assim uma arquitetura tridimensional complexa (HARRIOTT et al., 2011) e sendo um importante fator de virulência, uma vez que é responsável por provocar alterações no funcionamento celular, tornando os microrganismos mais resistentes, protegendo-os da resposta imune do hospedeiro, além de

impor uma barreira física aos agentes antissépticos (CHANDRA et al., 2004; HARRIOTT et al., 2011). O biofilme das PTs consiste, principalmente, em bactérias Gram-positivas e fungos, como a *Candida albicans* (PALEARI et al., 2011).

Somente a descontaminação das próteses pode evitar a formação desse biofilme sobre as peças protéticas. A indústria odontológica busca, cada vez mais, produtos que sejam bactericidas e fungicidas, evitando assim a contaminação cruzada e a manutenção de uma mucosa oral saudável em pacientes reabilitados com prótese dentária (MACHADO et al., 2009).

As próteses podem ser limpas mecanicamente, quimicamente ou com uma combinação de métodos (PELLIZZARO et al., 2012). A eficácia do método mecânico de escovação é limitada, porque a superfície da prótese é irregular e porosa. Além disso, pacientes idosos frequentemente perdem a destreza manual. Assim, as próteses devem ser limpas quimicamente, como por imersão em soluções desinfetantes (MOFFA et al., 2011). Os métodos químicos, porém, apresentam desvantagens, pois a depender do tempo de imersão e tipos de soluções utilizadas, podem causar alterações nas propriedades físicas e químicas das resinas acrílicas (YARBOROUGH et al., 2016) ou, ainda, serem citotóxicos e irritantes aos tecidos orais.

Atualmente, há uma ampla gama de agentes disponíveis para uso com essa finalidade, incluindo glutaraldeído (SEHMI et al., 2016), digluconato de clorexidina (AOUN et al., 2015), perborato de sódio (PAWASHE et al., 2017) e hipoclorito de sódio (PELLIZZARO et al., 2012), porém muitos deles podem interferir na estética das próteses gerando um efeito de branqueamento e manchas na superfície, como o digluconato de clorexidina, ou serem citotóxicos e irritantes aos tecidos orais, como o hipoclorito de sódio (PELLIZZARO et al., 2012).

O digluconato de clorexidina (CLX) é um agente antisséptico e desinfetante eficaz e continua a ser o padrão ouro, não superado por outros agentes (AOUN et al., 2015; PARASKEVAS, 2005) e é ativo contra várias bactérias, vírus e fungos, incluindo *C. albicans* (SCHEIBLER et al., 2018). Sua eficácia clínica e microbiológica no tratamento da estomatite protética tem sido comprovada (SCHEIBLER et al., 2017; PAVARINA et al., 2003). No entanto, para limpeza de próteses removíveis, a clorexidina provoca vários efeitos adversos, como a descoloração dos dentes naturais e artificiais, manchas na resina acrílica e na língua, além de sabor desagradável (PEGORARO et al., 2014).



Várias técnicas de limpeza estão sendo estudadas para suprir essa necessidade de se obter um agente eficaz de desinfecção de PTs e que, ao mesmo tempo, seja biocompatível aos tecidos bucais.

Nessa perspectiva de desenvolver meios que sejam eficazes na limpeza de PTs e biocompatíveis aos tecidos bucais, o interesse da comunidade científica sobre os fitoterápicos está crescendo e a utilização das plantas medicinais tem sido amplamente investigada. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte para se obter uma variedade de fármacos (PRASHAR et al., 2003) e têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular. Entre elas, está a produção de antissépticos tópicos, que têm demonstrado atividade antimicrobiana contra diversos tipos de microrganismos, como bactérias e fungos (DIEFENBACH et al., 2017; HERCULES et al., 2017).

Diante disso, tem-se investigado as ações antimicrobianas de diversos óleos de plantas (DALWAI et al., 2014; SALLES et al., 2015). O manjeriço (*Ocimum carnosum*), conhecido popularmente como alfavaca-do-mato, além de ser tradicionalmente usado como tempero alimentar, em perfumaria e indústrias médicas, vem sendo usado particularmente como antimicrobiano (SAKKAS et al., 2017), antifúngico (KOCIĆ-TANACKOV et al., 2012), antioxidante (SHIRAZI et al., 2014) e larvicida (POLITEO et al., 2007). Os óleos essenciais do *O. carnosum* exibem uma ampla e variada gama de compostos químicos, dependendo das variações nos quimiotipos, cores das folhas e das flores, aroma e origem das plantas (PEREIRA DE PAIVA et al., 2011). Os constituintes principais incluem chavicol éter metílico ou estragole, linalol e eugenol (RAO et al., 2011), este último tendo atividades antibacterianas comprovadas na literatura (ZHANG et al., 2011).

Diante da diversidade funcional do *O. carnosum*, este estudo teve como proposta avaliar a capacidade antimicrobiana de uma formulação contendo óleo essencial de alfavaca-do-mato agindo sobre biofilme duo-espécie das cepas de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* formado sobre espécimes de resina acrílica autopolimerizável, visando descobrir novos métodos eficazes e biocompatíveis para limpeza de próteses removíveis.

## 2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Ocimum carnosum* sobre biofilme duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* formado *in vitro* sobre espécimes de resina acrílica autopolimerizável.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) para a ação antimicrobiana da formulação, utilizando o óleo essencial de *Ocimum carnosum* sobre suspensão duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.
- Avaliar o potencial antimicrobiano da formulação utilizando o óleo essencial de *Ocimum carnosum* através do teste de viabilidade sobre biofilme duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* formado sobre espécimes de resina acrílica em diferentes tempos de imersão, de 1 hora e de 3 horas.

### 3. CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Assim sendo, esta dissertação é composta de um artigo científico que será submetido ao periódico *Brazilian Oral Research* - BOR (versão online ISSN 1807-3107), conforme descrito abaixo:

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum carnosum* EM  
BIOFILME DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* SOBRE  
ESPÉCIMES DE RESINA ACRÍLICA**

Marcella Maria Rocha Lima – (85) 981213134 – [marcellamariarl@hotmail.com](mailto:marcellamariarl@hotmail.com)

Ana Catarina Martins Reis – (71) 996492534 – [acmr\\_bio@hotmail.com](mailto:acmr_bio@hotmail.com)

Talita Arrais Daniel Mendes – (85) 999339092 – [talita\\_arrais@hotmail.com](mailto:talita_arrais@hotmail.com)

Kellen Miranda de Sá – (85) 988542433 – [kellenmiranda@ufc.br](mailto:kellenmiranda@ufc.br)

Maria Tayara Marques Freitas – (85) 996341005 – [tayaramarques@hotmail.com](mailto:tayaramarques@hotmail.com)

Juliano Sartori Mendonça – (85) 999951373 – [mendoncajs@hotmail.com](mailto:mendoncajs@hotmail.com)

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum carnosum* EM BIOFILME DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* SOBRE ESPÉCIMES DE RESINA ACRÍLICA**

**ANTIMICROBIAL EFFECT OF *Ocimum carnosum* ESSENTIAL OIL IN DUO-SPECIES BIOFILM**

**RESUMO**

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos que podem ser encontradas em Próteses Totais Orais (PTs). O interesse por fitoterápicos dar-se, pois os métodos de limpeza dessas próteses podem ser danosos aos tecidos bucais ou não são totalmente eficazes. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Ocimum carnosum* (OEOC) sobre biofilme duo-espécie formado sobre espécimes de resina acrílica. O OEOC foi extraído pela técnica de arraste a vapor. A concentração da droga foi determinada pela CIM (Concentração Inibitória Mínima) e pela CBM (Concentração Bactericida Mínima), obtendo-se como resultado uma concentração de 4% da droga para uso. Para o teste de viabilidade microbiana, utilizando *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, os grupos foram divididos em 3: 4% de OEOC; 0,12% de Digluconato de clorexidina (CLX) e diluente da droga (DIL), sendo cada grupo deixado por 1 hora e 3 horas de imersão. Os espécimes foram confeccionados com resina acrílica autopolimerizável e passaram por 3 triplicatas biológicas e 3 triplicatas técnicas. Os resultados foram obtidos por UFC/ml/mg e foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido de ANOVA 2 fatores e de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa SigmaPlot 11.0. O resultado mostrou que OEOC, para imersão de 1 hora, é semelhante estatisticamente à CLX ( $p > 0,05$ ) para *C. albicans*, entretanto o *S. mutans*, para imersão de 3 horas, com eficácia superior à CLX e ao diluente da formulação. Dessa forma, o OEOC tem efeito antimicrobiano comprovado contra microrganismos presentes no biofilme formado sobre próteses.

**Descritores:** biofilme dentário, antibacterianos, antifúngicos e fitoterápicos.

## 1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades de microrganismos compostos de uma ou várias espécies microbianas, sendo ligadas à superfície e incorporadas na matriz polimérica extracelular (1,2). A formação do biofilme está relacionada a mais de 60% das infecções crônicas em humanos devido a sua capacidade de se ligar e crescer em vários dispositivos médicos e odontológicos, incluindo, entre eles, as Próteses Totais Orais (PTs). O uso dessas próteses removíveis pode levar à mudança da microbiota e permitir a instalação de infecções microbianas (3), como a estomatite protética, que é uma inflamação generalizada da mucosa coberta pela prótese (4).

Técnicas de limpeza das próteses totais são recomendadas como procedimentos indispensáveis para prevenir a contaminação cruzada e a manutenção de uma mucosa oral saudável (5). Os métodos químicos para limpeza de próteses removíveis são os mais utilizados, porém, apesar de eficazes, apresentam desvantagens, pois a depender do tempo de imersão e tipos de soluções utilizadas, podem causar alterações nas propriedades físicas e químicas das resinas acrílicas (6), causando alterações na rugosidade das peças, manchas ou ainda podem causar danos aos tecidos bucais (7).

Nessa perspectiva de desenvolver meios que sejam eficazes na desinfecção de PTs e biocompatíveis aos tecidos bucais, o interesse da comunidade científica sobre os fitoterápicos está crescendo e a utilização das plantas medicinais tem sido amplamente investigada. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte para se obter uma variedade de fármacos (8) e têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos, os quais têm demonstrado atividade antimicrobiana contra diversos tipos de microrganismos, como bactérias e fungos (9). Diante disso, os pesquisadores vêm investigando as ações antimicrobianas de diversos óleos essenciais de planta (10,11).

O manjeriço (*Ocimum carnosum*), conhecido popularmente como alfavaca-do-mato, pode apresentar um efeito antimicrobiano (12) eficaz contra os microrganismos presentes no biofilme formado sobre as próteses removíveis, além de diminuir os efeitos adversos causados por soluções de limpeza química costumeiramente usadas para este fim. O manjeriço além do seu efeito antimicrobiano (12), apresenta também atividades antioxidantes (11) e larvicida (10). Os óleos essenciais do *O. carnosum* exibem uma ampla e variada gama de

compostos químicos, dependendo das variações nos quimiotipos, cores das folhas e das flores, aroma e origem das plantas (13). Os constituintes principais incluem chavicol éter metílico ou estragole, linalol e eugenol (14), este último tendo atividades antibacterianas comprovadas na literatura (15).

Diante da diversidade funcional do *Ocimum carnosum*, este estudo teve como proposta avaliar a capacidade antimicrobiana da alfavaca-do-mato, através do uso da formulação produzida com seu óleo essencial, numa concentração de 4%, agindo sobre biofilme duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Tipo de estudo**

Esse estudo é do tipo laboratorial experimental ou *in vitro*, com análise quantitativa. Os procedimentos laboratoriais foram executados nos laboratórios de pesquisa da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### **2.2 Obtenção da planta *Ocimum carnosum***

As folhas da *Ocimum carnosum* eram coletadas por um jardineiro profissional, no horto de plantas medicinais da UFC, localizado no *campus* do Pici, em dias ensolarados, sempre entre as 7h30 e 9h30 da manhã. A identificação taxonômica das plantas foi realizada pelo botânico LWLV, em 20/07/2018, e seu número de registro foi 61272 - *Ocimum carnosum* (Spreng.) Link & Otto ex Benth.

### **2.3 Extração dos óleo essencial da *Ocimum carnosum* e preparo da formulação**

Os óleos essenciais das folhas foram extraídos pela técnica de arraste a vapor. O volume de óleo essencial obtido foi medido e armazenado em frascos de vidro na cor âmbar, hermeticamente fechados com tampas de borracha, cobertos com papel alumínio para proteger o conteúdo da luz e foram mantidos sob refrigeração a 8 °C, até o momento de sua utilização (16).

Para preparo da formulação, foram utilizados 320 µL de óleo, 25 µL de Tween 20 (agente emulsificador), 5 µL de etanol e 150 µL de PBS. Em seguida, essa emulsão foi homogeneizada em agitador vórtex e usada imediatamente.

## 2.4 As cepas padrões e condições de cultura

Nesta pesquisa, foram utilizados os microrganismos *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC 700610) e *Candida albicans* (ATCC 10532). Inicialmente, os microrganismos foram retirados do estoque e semeados em BHI Agar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado para *S. mutans* e Agar Sabourand para *C. albicans*. As placas foram incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Após a análise morfológica, as colônias de *S. mutans* foram transferidas para o caldo de cultura BHI (Brain Heart Infusion) (Difco Detroit, Michigan, USA), suplementado com 1% de glicose (17), e incubadas por 18 horas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. De modo semelhante, as colônias de *C. albicans* foram inoculadas em caldo de cultura BHI e crescidas por 18h a 37°C em uma atmosfera convencional (CLSI, 2006).

Após o período de incubação, uma alíquota do crescimento microbiano foi retirada e semeada mais uma vez em BHI Agar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, como descrito anteriormente. Após o crescimento, de três a cinco colônias bem isoladas e com o mesmo tipo morfológico foram coletadas com *swab* estéril e transferidas para um tubo contendo 4 a 5 ml de solução salina para ajuste da turbidez equivalente a de um padrão de 0,5 McFarland, o que corresponde a uma suspensão microbiana de, aproximadamente, 1 a 5 x 10<sup>7</sup> de células por ml para leveduras e 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml para bactérias (10,11). Então, foi realizado o plaqueamento, para confirmação, através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias por ml (UFC) (CLSI, 2006).

## 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do OEOC em culturas planctônicas

### 2.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo foi usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial da *Ocimum carnosum* (OEOC) frente à *C. albicans* e *S. mutans* de acordo com recomendações do CLSI, 2012.

Para o referido teste, utilizou-se placas de 96 poços de fundo em “U” e foram realizadas diluições seriadas na base dois (32% a 0,015%) a partir da droga na concentração inicial (64%). O inóculo de *S. mutans* e *C. albicans* foi ajustado para a escala padrão 0,5 de McFarland e realizado como descrito no item 2.4 (CLSI, 2012). No entanto, a suspensão de

trabalho de *C. albicans* foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 (NCCLS, 2002).

Cada poço da placa foi preenchido com 5 µl de cada inóculo microbiano + 100 µl de cada concentração da droga + 100 µl de meio BHI. Resultando em concentração de aproximadamente,  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células por ml e  $5 \times 10^6$  UFC/ml para *C. albicans* e *S. mutans*, respectivamente (NCCLS, 2002; CLSI, 2012).

Para cada experimento, foram utilizados os seguintes grupos controles:

- Controle de esterilidade: 100 µl de BHI sem bactéria e 100 µl da droga;
- Controle positivo: 100 µl de Digluconato de clorexidina (Periogard, Colgate, Palmolive Industrial Ltda, São Paulo, Brasil), 100 µl de BHI e 5 µl de cada inóculo;
- Controle do diluente: 100 µl de Diluente da formulação, 100 µl de BHI e 5 µl de cada inóculo;
- Controle de crescimento: 100 µl de BHI e 5 µl de cada inóculo.

As placas foram incubadas durante 24h a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Em seguida, a CIM foi determinada por inspeção visual como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Vale ressaltar que uma alíquota do poço referente ao controle de crescimento foi plaqueada em placa de Agar Mitis Salivarius e Agar Sabouraud Dextrose para aferição da concentração em UFC equivalente ao inóculo/suspensão utilizada. O experimento foi realizado em triplicatas técnicas, no mesmo dia, e em triplicatas biológicas em dias diferentes.

### 2.5.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, foram selecionados os poços que não apresentaram turvação no ensaio da CIM e o conteúdo dos mesmos foram plaqueados. Para isso, 25 µl do conteúdo dos poços foram subcultivados em placas de Agar Mitis Salivarius e Agar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C em atmosfera convencional ou a 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as culturas foram analisadas para verificação visual do crescimento bacteriano. A CBM foi definida como a concentração mínima de droga necessária para matar a maioria ( $\geq 99,9$  %) dos organismos viáveis após incubação. O experimento foi realizado três vezes (16).



## **2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana do OEOC em biofilmes duo-espécie formados sobre discos de resina acrílica**

A obtenção do óleo essencial, a ativação e a inoculação das cepas microbianas estão detalhadas nos itens 2.3, 2.4 e 2.5.

### *2.6.1 Confeção dos espécimes*

Para confecção dos espécimes, utilizou-se uma matriz cilíndrica de silicone de condensação (Zetalabor, Zermack, S.P.A., Labordental Ltda., São Paulo, SP) com aproximadamente 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura, seguindo os padrões da *International Organization for Standardization* - ISO 1567 (ISO, 1998). O material de escolha foi a resina acrílica autopolimerizável da marca Vipi, de cor rosa (Vipiflash, Vipi produtos odontológicos, São Paulo). Para confecção de cada corpo de prova, o padrão de silicone foi lubrificado com vaselina sólida (Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, São José do Rio Preto, SP, Brasil), utilizando pincel do tipo pelo de marta nº 36 (Kota Imports, São Paulo, SP, Brasil). Pó e líquido foram proporcionados de acordo com o fabricante. Em seguida, foram misturados em pote *dappen* de vidro (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos LTDA, Maringá, PR, Brasil) com espátula nº 1 (Kota Imports, São Paulo, SP, Brasil), e a mistura foi inserida na matriz de silicone de modo a evitar a incorporação de bolhas de ar. Para isto, a matriz de silicone foi colocada sobre uma placa de vidro (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) e a mistura inserida de forma lenta até que toda a matriz fosse preenchida. Por fim, uma lâmina de vidro (Prolab, São Paulo, SP, Brasil) foi pressionada na outra extremidade da matriz de silicone, de forma que esta extremidade também ficasse uniforme e lisa. Após o tempo de polimerização do material, os espécimes foram removidos da matriz. O acabamento de ambas as faces planas foi realizado em politriz (Metaserv 200), com lixas d'água (Norton Indústria Brasileira, São Paulo, São Paulo, Brasil) de granulações #220, #400, #600, #1200 e #2400, por 30 segundos cada face e, após isso, as medidas foram confirmadas por meio de paquímetro digital (Model CD-6'' CSX-B; Mitutoyo Sul Americana LTDA., Suzano, Brasil). Aqueles espécimes que não apresentaram superfície regular foram eliminados. No total, foram confeccionados 54 espécimes, que foram esterilizados em autoclave a 121 °C (Phoenix, Lufenco, Araraquara- SP-Brasil).

A fim de confirmar a efetividade da esterilização, dois espécimes adicionais foram confeccionados para cada grupo e imersos em tubos de ensaio contendo meio de cultura *Tryptic*

*Soy Broth* (TSB), a 37 °C, por 48 horas. A esterilização foi considerada bem-sucedida pela ausência de crescimento microbiano após esse período.

### 2.6.2 *Delineamento experimental*

O estudo *in vitro* foi conduzido de acordo com um delineamento em espécimes de resina acrílica, onde os fatores em estudo foram: Compostos antimicrobianos utilizados e período de imersão da droga. Os grupos experimentais utilizados nesta etapa estão descritos no Quadro 1.

### 2.6.3 *Formação dos biofilmes*

Após a esterilização dos espécimes, eles foram distribuídos aleatoriamente entre cada um dos grupos, segundo relatado no delineamento experimental.

Aos poços da placa de cultura de 24 poços foram adicionados 18,75 µl do inóculo de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* ( $10^8$  UFC/ml), 750 µl do meio de cultura BHI + sacarose.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub> e, após 24h, os espécimes de cada poço foram lavados em 750 µl de solução salina 0,89%, cuidadosamente, três vezes, para a remoção das células fracamente aderidas às superfícies. Os espécimes foram então transferidos para uma nova placa contendo 750 µl de meio de cultura BHI com sacarose, e as placas foram novamente incubadas a 37±1°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 24 horas para crescimento do biofilme (17).

Após esse período, os espécimes apresentaram, em sua superfície, uma substância não celular, a qual se assemelha a uma “névoa” (18,19). Então, dentro da câmara de fluxo laminar, os grupos foram expostos aos tratamentos.

### 2.6.4 *Análise da composição microbiana dos biofilmes*

Para a contagem microbiológica, os espécimes foram transferidos individualmente e imersos em tubos de microcentrífuga estéreis contendo 1 ml de solução salina 0,89%. Os tubos passaram por sonicação, 45 segundos com 3 pulsos de 15 s e intervalo no gelo, para desprendimento dos microrganismos aderidos ao espécime para a solução (20).

Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas a partir dessa solução resultante. Para isso, uma alíquota de 100 µl da solução resultante foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio contendo 900 µl de solução salina estéril. Este último tubo foi agitado, vigorosamente, em agitador de tubos, e uma nova alíquota de 100 µl foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 µl de solução salina. Este procedimento foi realizado 7 vezes para cada espécime e, dessa forma, as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  foram obtidas. Então, três gotas contendo 10 µl de cada uma das diluições foram semeadas em placas de Petri, com um meio de cultura Agar Mitis Salivarius e Agar Sabouraud Dextrose para o crescimento de *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente, em triplicata (21). As placas foram armazenadas em estufa a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas e, após o crescimento das colônias, o número de UFC/ml/mg foi calculado. Os dados obtidos foram transformados em logaritmos de base dez ( $\log_{10}$ ) para realização dos testes estatísticos. O experimento foi conduzido em triplicata.

#### 2.6.5 Análise de peso seco do biofilme

Para a análise do peso seco do biofilme formado, alíquotas de 200 µl da suspensão de biofilme do tubo de microcentrífuga, contendo os espécimes previamente sonicados, foram transferidas para tubos de microcentrífuga (Eppendorf ® AG, Hamburg- Alemanha) limpos e pré-pesados e a eles foram acrescentados 600 µl de álcool etílico 99,9% previamente armazenado a -20 °C, e as suspensões foram armazenadas a -20 °C pelo período mínimo de 24 horas.

Após a remoção do congelador a -20 °C, as suspensões foram vortexadas e centrifugadas durante 10 min a -4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 500 µl de álcool etílico a 70% foram novamente adicionados. A nova suspensão foi vortexada e centrifugada por mais 5 min a -4 °C, sendo o sobrenadante descartado. Sequencialmente, os microtubos contendo os precipitados foram colocados em um dissecador por 48 horas até a remoção total da umidade interna e, em seguida, foram pesadas em balança de precisão (22).

#### 2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa Excel 2013. Em seguida, utilizou-se o programa estatístico SigmaPlot 11.0 para análise dos dados que foram transformados em  $\log_{10}$  e, posteriormente, foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguidos de análise de variância ANOVA a dois critérios para *C. albicans*, e teste não

paramétrico de Kruskal Wallis para *S.mutans*, seguido de pós-teste de Tukey com um nível de significância de 5% para ambos os microrganismos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM)

O poço da placa de 96 poços utilizado no teste de CIM que não apresentou turvação visível foi aquele contendo 4% da concentração da formulação. A placa foi avaliada em espectrofotômetro posteriormente para confirmar o resultado. O resultado da CBM apresentou a mesma concentração determinada na CIM.

#### 3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do OEOC em biofilmes duo-espécie formados sobre discos de resina acrílica

Na avaliação das soluções para tratamento de *C. albicans*, pode-se observar (Tabela 1) que a diferença nos valores médios do tempo de imersão influencia nos tratamentos utilizados ( $p < 0,001$ ).

Na imersão de 1h de resina acrílica nas soluções, pode-se observar que o OEOC ( $4,4 \pm 1,0$  UFC/mg) foi estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) ao DIL ( $6,1 \pm 0,2$  UFC/mg), no entanto não se observou ( $p > 0,05$ ) em relação à CLX ( $5,7 \pm 0,4$  UFC/mg). No tempo de aplicação de 3h, pode-se notar que tanto o OEOC ( $4,9 \pm 1,0$  UFC/mg) quanto o CLX ( $4,9 \pm 0,6$  UFC/mg) foram melhores que o DIL ( $5,3 \pm 1,1$  UFC/mg) na inibição desse microrganismo ( $p < 0,05$ ). Para a comparação dos tratamentos nos diferentes tempos, nota-se que apenas o CLX apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sendo mais eficaz com 3 horas de aplicação.

Na análise estatística das soluções contra biofilme de *S. mutans*, pode-se notar que os valores médios referentes aos tratamentos em relação ao tempo apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Entretanto, os diferentes níveis de solução não dependem do tempo de aplicação ( $p = 0,469$ ).

Pode-se notar que, no intervalo de uma hora, a imersão de resina acrílica em solução de OEOC ( $3,3 \pm 1,8$  UFC/mg) demonstrou ser superior ( $p < 0,05$ ) na inibição de *S. mutans* quando comparada ao DIL ( $6,4 \pm 0,7$  UFC/mg), sendo o CLX semelhante ao OEOC e ao DIL

nesse período de imersão ( $p > 0,05$ ). No intervalo de imersão de 3h, pode-se observar que OEOC ( $1,6 \pm 1,0$  UFC/mg) e CLX ( $2,9 \pm 0,5$  UFC/mg) foram superiores na inibição de unidades formadoras de colônia quando comparadas ao diluente, sendo aqueles semelhantes entre si.

Quando se compara individualmente cada tratamento em diferentes períodos, nota-se que OEOC e DIL mantiveram seus resultados, independente do tempo de imersão, sendo que o CLX apresentou uma maior efetividade com três horas de imersão.

#### 4. DISCUSSÃO

Várias espécies microbianas formam o biofilme na superfície das próteses removíveis, incluindo a *C. albicans* e o *S. mutans* (23-25). Os métodos químicos associados ao método mecânico são os mais eficazes para limpeza das próteses (26), no entanto, a facilidade de uso, a capacidade de remover microrganismos nas microporosidades da superfície de resinas acrílicas e a incorporação de agente com atividade antimicrobiana são as principais vantagens de recomendar-se o uso de agentes químicos. A principal desvantagem, por sua vez, são os efeitos adversos, dependendo do tempo de imersão e da solução empregada (27-28).

Pode-se citar o digluconato de clorexidina 0,12%, que é um método químico eficaz contra a formação de biofilme (29). No entanto, apresenta efeitos adversos, tais como alteração na coloração dos elementos dentários, restaurações, próteses e língua, formação de cálculo supragengival, perda do paladar, queimaduras no tecido mole, dor, xerostomia e gosto residual desagradável na boca (30). Devido a esses efeitos adversos do digluconato de clorexidina, tem surgido o interesse de se desenvolver substâncias que sejam capazes de substituir seu uso.

Neste estudo, foi investigado o efeito antimicrobiano do OEOC em ensaios para avaliar os biofilmes formados *in vitro* por UFC/ml/mg para buscar-se um modelo eficaz para a desorganização desse biofilme, já que o uso de fitoterápicos estão, cada vez mais, ganhando espaço devido aos seus efeitos terapêuticos positivos e com poucos efeitos colaterais (31).

Não há estudos, até o presente momento, que mostram a eficácia do OEOC na desorganização de biofilme formado sobre próteses removíveis, dessa maneira foi aceito que o OEOC foi eficaz em inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, uma vez que os resultados mostraram, para análise de *C. albicans* e de *S. mutans*, que a formulação contendo óleo essencial de *O. carnosum* à 4% apresentou índices estatisticamente semelhantes à clorexidina ( $p > 0,05$ ), podendo ser usado para limpeza de próteses, já que produtos fitoterápicos são menos danosos aos tecidos humanos (32) em comparação ao CLX, com a

ressalva de que ainda deve passar por mais testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar os efeitos adversos sobre longevidade das próteses removíveis.

Os testes do estudo não só avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial usando bactéria e fungo em suspensão (avaliação CIM e CBM), mas também como ele poderia prevenir a formação de biofilme ou matar as células em um biofilme estruturado pré-formado.

Vale ressaltar que é uma pesquisa pioneira, então não há na literatura valores de CIM e CBM do óleo essencial de *Ocimum carnosum* frente ao *Streptococcus mutans* e a *Candida albicans*. Nesse estudo obteve-se valores semelhantes de CIM (4%) e CBM (4%). Esse resultado demonstra o potencial antimicrobiano do óleo essencial contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, que são microrganismos frequentemente isolados de biofilmes de próteses removíveis (33).

Estudos prévios indicam que concentrações de fármaco superiores à CIM são necessárias para atingir um efeito antibiofilme (34,35). Neste estudo, os biofilmes formados diminuíram a contagem em UFC na mesma concentração de CIM. A constatação de que o óleo essencial de *O. carnosum* foi capaz de inibir o crescimento do biofilme, mesmo em concentração igual à CIM, aponta para este óleo como um composto promissor a ser incorporado em formulações farmacêuticas para seu uso.

Aumentando-se a concentração do OEOC, em futuros estudos, provavelmente pode-se diminuir o tempo de ação da formulação, o que pode implicar em melhor aplicabilidade clínica.

Quando se compara o potencial antimicrobiano de outros óleos essenciais estudados (36,37), pode-se avaliar que mostraram inibição frente a microrganismos presentes no biofilme, entretanto, ao compararmos estes à CLX, esta se mostra superior. Demonstra-se que os resultados do trabalho em discussão são excelentes, já que para *S. mutans* e *C. albicans*, a formulação de OEOC apresentou eficácia semelhante à CLX, que é um potente antimicrobiano.

Vale ressaltar, ainda, que o teste de viabilidade para análise antimicrobiana realizado no estudo não foi por difusão em ágar como nesses estudos testando outros óleos essenciais, demonstrando que o teste realizado é mais sensível para determinar os resultados, já que o teste de difusão em ágar é uma análise semi-quantitativa, a capacidade de difusão do composto de teste pode ter sido influenciada pela composição química dos óleos (38,39).

O presente estudo faz a análise, ainda, dos períodos de imersão das soluções, mostrando que para o intervalo de 1 hora, houve ação antimicrobiana do OEOC, mostrando a eficácia em um curto período de tempo da formulação quando comparamos ao tempo de ação

de outros métodos testados, como a terapia fotodinâmica (40), além de ser um método de difícil acesso, ainda, o seu tempo de exposição não possui uma aplicabilidade clínica como mostram alguns estudos (41,42). A formulação testada no estudo mostra, portanto, que o OEOC pode ter uma aplicabilidade clínica relevante, sendo eficaz e de fácil manipulação.

Quando se avalia a eficácia do OEOC frente ao *S.mutans*, pode-se concluir sua eficácia ao comparar com a CLX que é o padrão-ouro para o efeito na inibição de aderência e na inibição de formação de biofilmes desse microrganismo (32), porém, vale ressaltar, que a estudos mostram que a CLX é eficaz contra a formação do biofilme (43,44), mostrando a eficácia antimicrobiana no presente estudo em biofilme já formado por 48 horas. Observando-se, assim, que a formulação, contendo OEOC, pode ser avaliada, futuramente, também em biofilme formado sobre espécimes dentinários para analisar a sua eficácia frente a desmineralização dentária em lesões cariogênicas, podendo gerar produtos odontológicos promissores na inibição da desmineralização dentinária também.

Os resultados obtidos nas condições deste estudo mostram que o óleo essencial de *O. carnosum* possui potencial antimicrobiano contra *S. mutans* e *C. albicans*, o que pode permitir, futuramente, estudos de toxicidade, ensaios *in situ* e *in vivo*.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a formulação contendo o óleo essencial de *O. carnosum* à 4% tem um efeito antimicrobiano eficaz contra *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, mostrando melhor desempenho ainda para essa última.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbial Rev 2002; 15:167-93.
2. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Krnjajić D, Petrović J. Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Arh Vet Med 2008; 1:5-15.
3. Scheie AA, Petersen FC. The biofilm concept: Consequences for future prophylaxis of oral diseases. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15:4-12.
4. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-ribo JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral Med.2004 jul; v. 98, n. 1, p. 53-59.

5. Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J.* 2017 Dec 1;6(4):46-51.
6. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denturecleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *BrazDent J.* 2012; 23:547-54.
7. Botelho MA, Santos RA, Martins JG, Carvalho CO, Paz MC, Azenha C, et al. Comparative Effect of an Essential Oil Mouthrinse on Plaque, Gingivitis and Salivary *Streptococcus mutans* Levels: A Double Blind Randomized Study. *Phytother. Res.* 2009 SEP, Fortaleza, v. 23, n. 9, p. 1214-1219.
8. Politeo O, Jukic M, Milos M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry.* 2007; v. 101, n. 1, p. 379-385.
9. Prashar A, Hili P, Veness RG, Evans CS. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry, Londres.* 2003; v. 63, n. 5, p. 569-575.
10. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017 ; Vol.27-3
11. Pereira de Paiva MH, Pinheiro LL, Medeiros CZ. Studies on forensic nursing in Brazil: a systematic review of the literature. *Int Nurs Ver.* 2007; v. 64, n. 2, pp. 286-295.
12. Rao BR et al. Chemical and biological diversity in fourteen selections of four *Ocimum* species. *Natural product communications.* 2011; v. 6, n. 11, p. 1705-1710.
13. Zhang JW, LI SK, WU WJ. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules.* 2009; v. 14, n. 1, p. 273-278.
14. Marra J. Atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme. 2011; 105 p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
15. Arzmi MH, Dashper S, Catmull D, Cirillo N, Reynolds EC, et al. Coaggregation of *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain dependent. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15(5): 1-7.



16. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, et al. Biofilm formation by *C. albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016; 32(3): 329- 338.
17. Regis WFM, Reis ACM, Rocha FR, Guedes SFF, Maia DCBS, Rodrigues LKA. The Role of *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* Spent Culture Supernatant in Single and Dual- Species Biofilm. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2019; 14(4).
18. Samuels N, Grbic JT, Saffer AJ, Wexler ID, Williams RC. Effect of an herbal mouthrinse in preventing periodontal inflammation in an experimental gingivitis model: A pilot study. *Compend. Contin. Educ. Dent*. 2012; 33, 204–206, 208–211.
19. Uppuluri P, Pierce CG, López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol*. 2009; 4(10):1235–7.
20. Arzmi MH, Dashper S, Catmull D, Cirillo N, Reynolds EC, et al. Coaggregation of *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain dependent. *FEMS Yeast Res*. 2015; 15(5): 1-7.
21. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, Koo H. The influence of a novel propolis on *mutans streptococci* biofilms and caries development in rats. *Archives of Oral Biology*. 2006; 51(1), 15–22.
22. Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Inuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust. Dent. J*. 1997; 42,343-6.
23. Morgan TD, Wilson M. Anti-adhesive and antibacterial properties of a proprietary denture cleanser. *J. Appl. Microbiol*. 2000; 89,617-23.
24. Preshaw PM, Walls AW, Jakubovics NS, Moynihan PJ, Jepson NJ, Loewy Z. Association of removable partial denture use with oral and systemic health. *J. Dent*. 2011; 39, 711-9.
25. Teles FR, Teles RP, Sachdeo A, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, et al. Comparison of microbial changes in early redeveloping biofilms on natural teeth and dentures. *J. Periodontol*. 2012; 83,1139-48.
26. Paranhos HF, Bezzon OL, Davi LR, Felipucci DN, Silva CH, Pagnano VO. Effect of cleanser solutions on the color of acrylic resins associated with titanium and nickel-chromium alloys. *Braz Oral Res*. 2014; 28:1–7.
27. Pegoraro J, Silvestri L, Cara G, Stefenon L, Mozzini C B. Efeitos adversos do gluconato. *Materiais e Métodos. Journal Oral Investigations*. 2014; v. 3, n. 1, p. 33– 37.
28. 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; 33(3), 402–409.
29. Salles MM, Oliveira VC, Souza RF, Silva CHL, Paranhos HFO. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning – in vitro evaluation. *Brazilian Oral Research*. 2015; 29(1).
  30. Jainkittivong A, Aneksuk V, Langlais RP. Oral mucosal lesions in denture wearers. *Gerodontology*. 2010 Mar;27(1):26-32.
  31. Pires CW, Fraga S, Beck ACO, Braun KO, Peres PEC. Chemical Methods for Cleaning Conventional Dentures: What is the Best Antimicrobial Option? *Oral Health Prev Dent*. 2017;15. No. 1
  32. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res*. 2011;45(3):243-63.
  33. Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen IŞ. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, 2016, 1–8.
  34. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res*. 2017 Nov 6;31:e89.
  35. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J Ethnopharmacol*. 2006;106(3):290-302.
  36. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Brazilian Oral Research*. 2012; 31(0).
  37. Varela K S, A T, Vohra F, Malmstrom H, Yunker M., Varela K T, Javed F. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the disinfection of acrylic denture surfaces: A systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017; 17, 103–110.
  38. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29:827-33.
  39. Zoccolillo ML, Rogers SC, Mang TS. Antimicrobial photodynamic therapy of *S. mutans* biofilms attached to relevant dental materials. *Lasers Surg Med*. 2016.
  40. Haydari M, Bardakck AG, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, Preus HR. Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an

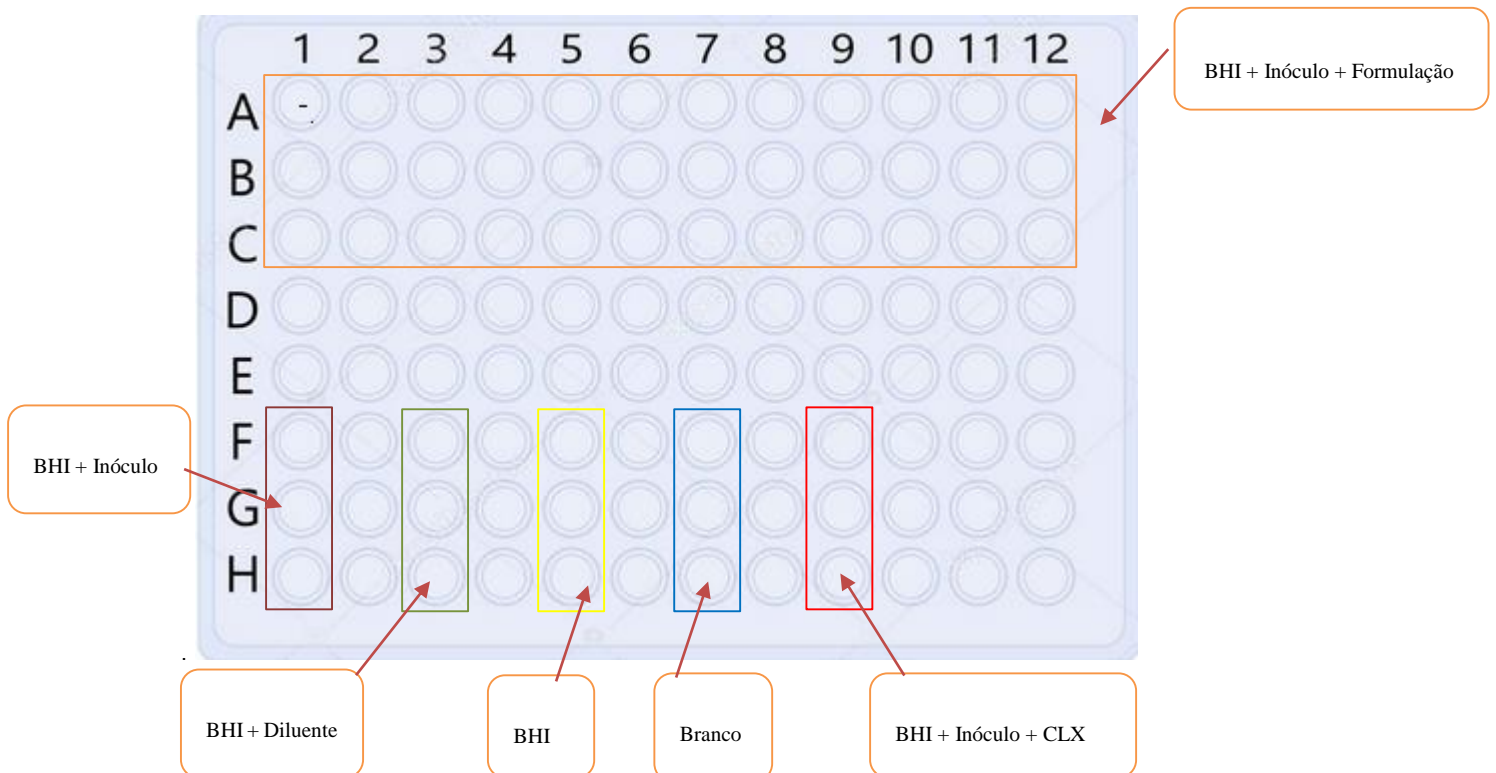
- experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health*. 2017; 17(1).
41. Harper PR, Milson S, Wade W, Addy M, Moran J, Newcombe RG. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque in vivo. *J Clin Periodontol*. 1995; 22:723–7
  42. Kawasaki K, Kamikawa Y, Sugihara K. In vitro and in vivo removal of oral *Candida* from the denture base. *Gerodontology*. 2014; 33(2), 247–252.
  43. Hilgert JB, Giordani JM, de Souza RF, Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Geriatr Soc*. 2016 Dec;64(12):2539-2545.
  44. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*. 2016 Jun;25(4):288-301

Quadro 1 – Descrição dos grupos experimentais utilizados para avaliação do efeito antimicrobiano do OEOC em biofilmes duo-espécie formados sobre discos de resina acrílica.

Grupos utilizados	Descrição dos tratamentos
Formulação contendo óleo essencial de <i>Ocimum carnosum</i> (OEOC)	Imersão por 1 hora/ 3 horas
Digluconato de clorexidina 0,12% (CLX)	
Diluyente da formulação (DIL)	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Esquema ilustrativo do teste de Microdiluição em caldo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1- Análises estatísticas Shapiro-Wilk, seguido de pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para *C. albicans*; ANOVA a dois critérios, seguidas de pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para *S. mutans*, nas quais as letras maiúsculas correspondem às comparações entre colunas, e as minúsculas, entre linhas.

Avaliação da inibição do crescimento do biofilme para <i>C.albicans</i> e <i>S. mutans</i> em diferentes períodos de imersão em diferentes tratamentos (UFC/mg/ml)				
	<i>S. mutans</i>		<i>C. albicans</i>	
	1H	3H	1H	3H
DEOC	3,3 ± 1,8 Aa	1,6 ± 1,0 Aa	4,4 ± 1,0 Aa	4,9 ± 1,0Aa
CLX	5,4 ± 0,6 ABa	2,9 ± 0,5 Ab	5,7 ± 0,4 ABa	4,9 ± 0,6Ab
DIL	6,4 ± 0,7 Ba	5,8 ± 1,2 Ba	6,1 ± 0,2 Ba	5,3 ± 1,1Ba

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### **4. CONCLUSÃO GERAL**

Com base nos resultados desse estudo *in vitro*, podemos concluir que a formulação contendo o óleo essencial de *O. carnosum* foi testada para o CIM e CBM, apresentando concentrações semelhantes para ambos (4%), mostrando seu efeito antimicrobiano no teste de viabilidade sobre biofilme duo-espécie de *S. mutans* e *C. albicans* sobre espécimes de resina acrílica nos tempos de imersão de 1 hora e de 3 horas, o que pode gerar, futuramente, estudos que possam promover sua aplicabilidade clínica.

## REFERÊNCIAS

© 2011 The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank 1818 H Street NW Washington DC 20433

AOUN, G.; CASSIA, A.; BERBERI, A. Effectiveness of a Chlorhexidine Digluconate 0.12% and Cetylpyridinium Chloride 0.05% Solution in eliminating *Candida albicans* Colonizing Dentures: A Randomized Clinical in vivo Study. *J Contemp Dent Pract*, Jun 1;16(6):433-6, 2015.

CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.*, v. 80, n. 3, p. 903-908, 2001.

DALWAI, S.; RODRIGUES, S. J.; BALIGA, S.; SHENOY, V. K.; SHETTY, T. B.; PAI, U. Y.; 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*, v. 33, n. 3, pp. 402-409, 2014.

DIEFENBACH, A. L.; MUNIZ, F. W. M. G.; OBALLE, H. J. R.; RÖSING, C. K. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 4, pp. 586-596, 2017.

GENDREAU, L.; LOEWY, Z. G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*, v. 20, n. 4, pp. 251-260, 2011.

HANNAH, V.E.; O'DONNELL, L.; ROBERTSON, D.; RAMAGE, G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J*, Dec 1;6(4):46-51, 2017.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.*, v. 19, n. 11, pp. 557-563, 2011.

HERCULES, S.; CHRISSANTHY, P. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol*, v. 23, n. 3, 2017.

HILGERT, J.B.; GIORDANI, J.M.; DE SOUZA, R.F.; WENDLAND, E.M.; D'AVILA, O.P.; HUGO, F.N. Interventions for the Management of Denture Stomatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Geriatr Soc*, Dec;64(12):2539-2545, 2016.

JAINKITTIVONG, A.; ANEKSUK, V.; LANGLAIS, R. P. Oral mucosal lesions in denture wearers. *Gerodontology*, v. 27, n. 1, pp. 26-32, 2010.

KOCIĆ-TANACKOV, S. D. et al. Antifungal activity of the basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Penicillium aurantiogriseum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, and *P. brevicompactum*. *Acta Periodica Technologica*, n. 43, p. 247-256, 2012.

KAWASAKI, K; KAMIKAWA, Y; SUGIHARA, K. In vitro and in vivo removal of oral *Candida* from the denture base. *Gerodontology*, 33(2), 247-252, 2014.

- MACHADO et al. Hardness and surface roughness of relined and denture base acrylic resins after repeated disinfection procedures. *The Journal of prosthetic dentistry*, v. 102, n. 2, p. 115-122, 2009.
- MOFFA, E. B.; GIAMPAOLO, E. T.; IZUMIDA, F. E.; PAVARINA, A. C.; MACHADO, A. L.; VERGANI, C. E. Colour stability of relined dentures after chemical disinfection. *Arandomised clinical trial. J Dent*, v. 39, pp. 56-71, 2011.
- MONTERO, J.; CASTILLO-OYAGÜE, R.; LYNCH, C. D.; ALBALADEJO, A.; CASTAÑO, A. Self-perceived changes in oral health-related quality of life after receiving different types of conventional prosthetic treatments: a cohort follow-up study. *J Dent*, v. 41, pp. 493-503, 2013.
- PALEARI et al. Effect of incorporation of 2-tert-butylaminoethyl methacrylate on flexural strength of a denture base acrylic resin. *Journal of Applied Oral Science*, v. 19, n. 3, p. 195-199, 2011.
- PARASKEVAS, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *International Journal of Dental Hygiene*, v. 3, pp. 162-178, 2005.
- PAVARINA, A. C.; PIZZOLITTO, A. C.; MACHADO, A. L.; VERGANI, C. E.; GIAMPAOLO, E. T. An infection control protocol: Effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*, v. 30, n. 5, pp. 532-536, 2003.
- PAWASHE, K. G.; TEWARY, S.; SANYAL, P. K.; NILESH, K. An In vitro Comparative Evaluation of Disinfectants on Standard and Clinical Microbial Strains on Heat Cure Resins. *J Clin Diagn Res*, v. 11, n. 5, pp. ZC54-ZC58, 2017.
- PEGORARO, J.; SILVESTRI, L.; CARA, G.; STEFENON, L.; MOZZINI, C. B. Efeitos adversos do gluconato Materiais e Métodos. *Journal Oral Investigations*, v. 3, n. 1, p. 33-37, 2014.
- PELLIZZARO, D.; POLYZOIS, G.; MACHADO, A. L.; GIAMPAOLO, E. T.; SANITÁ, V.; VERGANI, C. E. Effectiveness of mechanical brushing with different denturecleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *BrazDent*, v. 23, pp. 547-554, 2012.
- PEREIRA DE PAIVA, M. H.; PINHEIRO LAGES, L.; CAVALCANTI DE MEDEIROS, Z. Studies on forensic nursing in Brazil: a systematic review of the literature. *Int Nurs Rev.*, v. 64, n. 2, pp. 286-295, 2017.
- POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, v. 101, n. 1, p. 379-385, 2017.
- PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry, Londres*, v. 63, n. 5, p. 569-575, 2003.



RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKE, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; REDDING, S. W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Med.*, v. 98, n. 1, p. 53-59, 2004.

RAO, B. R. et al. Chemical and biological diversity in fourteen selections of four *Ocimum* species. *Natural product communications*, v. 6, n. 11, p. 1705-1710, 2011.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol*, Vol.27-3, 2017

SALLES, M. M., OLIVEIRA, V. de C., SOUZA, R. F., SILVA, C. H. L., & PARANHOS, H. de F. O. Antimicrobial action of sodium hypochlorite and castor oil solutions for denture cleaning – in vitro evaluation. *Brazilian Oral Research*, v. 29, n. 1, 2015.

SEHMI, S. K.; ALLAN, E.; MACROBERT, A. J.; PARKIN, I. The bactericidal activity of glutaraldehyde-impregnated polyurethane. *Microbiologyopen*, v. 5, n. 5, pp. 891-897, 2016. 1.

SHIRAZI MT, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food science & nutrition*, v. 2, n. 2, p. 146-155, 2014.

SCHEIBLER, E.; DA SILVA, R.M.; LEITE, C.E.; CAMPOS, M.M.; FIGUEIREDO, M.A.; SALUM, F.G.; CHERUBINI, K. Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. *Arch Oral Biol*, May; 89:70-76, 2018

SCHEIBLER, E.; GARCIA, M.C.R.; MEDINA DA SILVA, R.; FIGUEIREDO, M.A.; SALUM, F.G.; CHERUBINI. Use of nystatin and chlorhexidine in oral medicine: Properties, indications and pitfalls with focus on geriatric patients. *Gerodontology*, Sep;34(3):291-298,2017

ZHANG, J. W.; LI, S. K.; WU, W. J. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules*, v. 14, n. 1, p. 273-278, 2009.

YARBOROUGH, A.; COOPER, L.; DUQUM, I.; MENDONÇA, G.; MCGRAW, K.; STONER, L. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont*, Jun;25(4):288-301,2016.

