

Letícia de Albuquerque Bogéa Fecury

Uso do extrato de mastruz em biofilmes de *Candida albicans* desenvolvidos em resina acrílica para prótese dental: atividade antifúngica, citotóxica e sobre propriedades da resina

São Luís

2019

Letícia de Albuquerque Bogéa Fecury

Uso do extrato de mastruz em biofilmes de *Candida albicans* desenvolvidos em resina acrílica para prótese dental: atividade antifúngica, citotóxica e sobre propriedades da resina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre em Odontologia Área de Concentração: Odontologia Integrada.

Orientador: Profa. Dra. Leticia Machado Goncalves

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Bennini Paschoal

São Luís

2019

Nome: Letícia de Albuquerque Bogéa Fecury

Título: Uso do extrato de mastruz em biofilmes de *Candida albicans* desenvolvidos em resina acrílica para prótese dental: atividade antifúngica, citotóxica e sobre propriedades da resina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em : _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A vida é um constante recomeço. Assim, esses anos que se passaram, não marcam somente o fim de uma etapa, mas também o início de outra. Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre souberam a importância do meu estudo e me incentivaram durante todo esse tempo. A eles que souberam elogiar e cobrar, pois assim consegui amadurecer e concluir meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade do estudo e por todo o apoio e luz que me deu durante esse tempo.

Aos meus pais, por me incentivarem, ajudarem a crescer e amadurecer nesta etapa tão importante.

Ao meu irmão, que, talvez mesmo sem perceber, sempre foi uma fonte de inspiração.

E à minha orientadora, quem admiro e ajudou fundamentalmente a realizar este trabalho.

Obrigada a todos que fizeram parte disso.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo”

Winston Churchill

FECURY LAB. Uso do extrato de mastruz em biofilmes de *Candida albicans* desenvolvidos em resina acrílica para prótese dental: atividade antifúngica, citotóxica e sobre propriedades da resina. [Dissertação]. Sao Luís, Universidade CEUMA; 2019.

RESUMO

Introdução: Considerando o desafio para o controle da candidose associada ao uso de prótese dental, a busca por substâncias antifúngicas a partir de fontes naturais se tornou uma tendência na literatura médico-odontológica. Objetivo: Este estudo investigou o efeito antifúngico do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (ECA) na susceptibilidade a biofilmes de *Candida albicans*, bem como seu potencial citotóxico, e alterações na cor e rugosidade da resina acrílica. Materiais e Métodos: A solução hidro-alcoólica de ECA foi preparado e caracterizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A susceptibilidade da *C. albicans* ao ECA foi investigada pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM). Discos de resina acrílica foram confeccionados e, sobre estes, biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos por 48 h. Após, foram imersos por 10 minutos em (1) PBS (controle negativo), (2) hipoclorito de sódio 1% (HP1%, controle positivo) ou (3) ECA na CIM ou (4) 5xCIM. Os biofilmes foram investigados quanto à contagem e atividade metabólica. O potencial citotóxico em queratinócitos e fibroblastos foi verificado através do teste de MTT. A alteração de cor e rugosidade da resina

acrílica foi analisada após 28 dias de imersão no ECA. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, considerando a significância de 5%. Resultados: Os principais compostos detectados pelo CLAE foram kaempferol e quercetina. Tanto a CIM como a CFM do ECA obtiveram o valor de 0.25 mg/mL. A CIM foi suficiente para reduzir significativamente a contagem e atividade das células do biofilme ($p < 0.0001$), enquanto 5xCIM resultou na quase completa erradicação, semelhante ao HS1%. Queratinócitos e fibroblastos expostos à CIM e 5xCIM apresentaram viabilidade celular similar ao grupo controle ($p > 0.05$). Não foram detectadas alterações importantes de cor e rugosidade na resina acrílica mesmo após 28 dias. Conclusão: a imersão da resina acrílica para prótese dental em extrato de *C. ambrosioides* (ECA) na sua concentração inibitória mínima foi efetiva na redução de biofilmes de *C. albicans* sem evidências de efeitos citotóxicos ou alteração da rugosidade e cor deste substrato.

Palavras-chave: *prótese; cândida; resina; biofilme.*

FECURY LA. Use of mastruz extract in *Candida albicans* biofilms developed in acrylic resin for dental prostheses: antifungal activity, cytotoxic and resin properties. [Dissertation]. Sao Luis, Universidade CEUMA; 2019.

ABSTRACT

Introduction: Considering the challenge to control candidosis associated with the use of dental prostheses, the search for antifungal substances derived from natural sources has become a trend in the medical-dental literature. Objective: In this study the following effects of the extract of *Chenopodium ambrosioides* (ECA) were investigated: action against biofilms of *Candida albicans*, its cytotoxic potential, and changes caused in color and roughness of acrylic resin. Materials and Methods: The hydroalcoholic solution of ECA was prepared and characterized by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The susceptibility of *C. albicans* to ECA was investigated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) tests. Acrylic resin discs were fabricated, and *C. albicans* biofilms were developed on these for 48 h. Afterwards the discs were immersed for 10 minutes in: (1) PBS (Negative Control); (2) 1% Sodium Hypochlorite (SH1%, Positive Control) or (3) ECA at MIC or (4) 5xMIC. The biofilms were investigated relative to counts and metabolic activity. The cytotoxic potential in keratinocytes and fibroblasts was verified by means of the MTT test. Change in color and roughness of the acrylic resin

was analyzed after 28 days of immersion in ECA> The data were analyzed by the ANOVA test considering a 5% level of significance. Results: The main compounds detected by HPLC were kaempferol and quercetin. Both the MIC and MFC of ECA obtained the value of 0.25 mg/mL. The MIC was sufficient to significantly reduce the counts and activity of the biofilm cells, ($p < 0.0001$), while 5xMIC resulted in almost complete eradication, similar to the performance of SH1%. Keratinocytes and fibroblasts exposed to the MIC and 5aMIC presented cell viability similar to that of the Control Group ($p > 0.05$). No important changes in acrylic resin color and roughness were detected, even after 29 days. Conclusion: It could be included that the immersion of acrylic resin for dental prostheses in the extract of *C. ambrosioides* (ECA) in its minimum inhibitory concentration was effective for the reduction of *C. albicans* biofilms without any evidence of cytotoxic effects or changes in roughness and hardness of this substrate.

Keywords: *dental prostheses; biofilm; resin; candida.*

SUMARIO

CAPITULO 1

Título	13
Resumo	14
Introdução	15
Materiais e Métodos	19
Resultados	26
Discussão	35
Conclusão	40
Agradecimentos	41
Conflitos de Interesse.....	41
Referências	41

CAPITULO 1

USO DO EXTRATO DE MASTRUZ EM BIOFILMES DE *CANDIDA ALBICANS* DESENVOLVIDOS EM RESINA ACRÍLICA PARA PRÓTESE DENTAL: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA E SOBRE PROPRIEDADES DA RESINA ACRÍLICA

Letícia Fecury de Albuquerque^{1¶}, Letícia Machado Gonçalves^{1¶*}

¹ Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Ceuma, São Luís, Maranhão, Brasil.

¶ Autores contribuíram igualmente para a realização do trabalho.

* Autor correspondente

Laboratório de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade CEUMA, Rua Josué Montello, 1 – Jardim Renascença II, São Luís, MA, Brazil, 65075-120. Phone: +55 98 3214-4127. E-mail: lets.mg@gmail.com

Este artigo foi normatizado de acordo com a revista Plos One.

RESUMO

Considerando o desafio para o controle da candidose associada ao uso de prótese dental, a busca por substâncias antifúngicas a partir de fontes naturais se tornou uma tendência na literatura médico-odontológica. Este estudo investigou o efeito do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (ECA) em biofilmes de *Candida albicans*, seu potencial citotóxico, efeito antifúngico e alterações na cor e rugosidade da resina acrílica. A solução hidro-alcoólica de ECA foi preparado e caracterizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A susceptibilidade da *C. albicans* ao ECA foi investigada pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Discos de resina acrílica foram confeccionados e, sobre estes, biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos por 48 h. Após, foram imersos por 10 minutos em (1) PBS (controle negativo), hipoclorito de sódio (2) 1% (HP1%, controle positivo) ou (3) ECA na CIM ou (4) 5xCIM. Os biofilmes foram investigados quanto à contagem e atividade metabólica. O potencial citotóxico em queratinócitos e fibroblastos foi verificado através do teste de MTT. A alteração de cor e rugosidade da resina acrílica foi analisada após 28 dias de imersão no ECA. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, considerando a significância de 5%. Os principais compostos detectados pelo CLAE foram kaempferol e quercetina. Tanto a CIM como a CFM do ECA obtiveram o valor de 0.25 mg/mL. A CIM foi suficiente para reduzir significativamente a contagem e atividade das células do biofilme ($p < 0.0001$), enquanto 5xCIM resultou na quase completa

erradicação, semelhante ao HS1%. Queratinócitos e fibroblastos expostos à CIM e 5xCIM apresentaram viabilidade celular similar ao grupo controle ($p>0.05$). Não foram detectadas alterações importantes de cor e rugosidade na resina acrílica mesmo após 28 dias. Pode-se concluir que a imersão da resina acrílica para prótese dental em extrato de *C. ambrosioides* (ECA) na sua concentração inibitória mínima foi efetiva na redução de biofilmes de *C. albicans* sem evidências de efeitos citotóxicos ou alteração da rugosidade e cor deste substrato.

INTRODUÇÃO

No intuito de restabelecer a função, estética e saúde bucal de pacientes parcial ou totalmente desdentados, próteses dentais removíveis confeccionadas em resina acrílica à base de poli (metil metacrilato) (PMMA) constituem uma excelente opção de tratamento [1]. Após a instalação na cavidade bucal, as próteses são expostas a diversos microrganismos, os quais podem aderir a esta superfície e, caso o processo não seja interrompido por meio de higienização adequada ou tratamento com antifúngicos, resultará no desenvolvimento de comunidades microbianas denominadas de biofilme [2]. O acúmulo deste biofilme funciona como reservatório de microrganismos com potencial de causar infecções como a candidose associada ao uso de próteses, a qual tem a *Candida albicans* como principal microrganismo envolvido na sua etiologia [3].

O método mais popular para controle do biofilme sobre a prótese é a escovação com dentifrício, sendo de fácil acesso e baixo custo [4]. No entanto, a resina acrílica apresenta poros e, em algumas situações, as cerdas da escova não conseguem acessar e limpar adequadamente estes poros [5]. Somado a isto, sabe-se que muitos usuários de próteses são pacientes idosos, os quais podem apresentar acuidade visual diminuída ou mesmo perda da habilidade motora, comprometendo a limpeza adequada [6].

A imersão em soluções desinfetantes ou limpadores químicos tem sido sugerido como um importante método auxiliar para a eliminação do biofilme [7]. Dentre as soluções, o hipoclorito de sódio é amplamente empregado, sendo capaz de realizar uma limpeza eficiente [8,9]. Apesar de seus resultados favoráveis, apresenta desvantagens, tais como sabor e odor desagradáveis, além de alteração da resistência e cor da resina acrílica quando usada em regime prolongado [8-10]. Os limpadores químicos são substâncias disponíveis comercialmente, cuja ação de limpeza ocorre pelo efeito mecânico exercido pela efervescência produzida quando o produto é dissolvido na água, resultando em uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio [11]. Alguns estudos investigaram o efeito de diferentes limpadores em biofilme formado na superfície de próteses [12,13], no entanto, observa-se que este método é falho na remoção de biofilmes de *C. albicans* [11-13].

Em situações que a candidose torna-se uma infecção persistente ou recorrente, tem-se preconizado a prescrição de antifúngicos, dentre os quais se destaca o grupo dos polienos e dos

azóis (*i.e.* nistatina e fluconazol, respectivamente) [14]. O uso indiscriminado destes agentes antifúngicos parece ter sido o fator preponderante para a seleção de cepas resistentes de *C. albicans* [15,16]. Além disso, a complexa estrutura do biofilme formado parece dificultar a difusão e, conseqüentemente, limitar ação dos agentes antifúngicos nas próteses de PMMA. [16].

Assim, as limitações oferecidas pelo controle químico/mecânico do biofilme têm implicações importantes no insucesso do tratamento da candidose associada ao uso de próteses. Dessa forma, a busca por substâncias antifúngicas a partir de fontes alternativas se tornou uma tendência na literatura médico-odontológica [17-19]. Considerando que a maioria dos agentes antifúngicos existentes no mercado é de origem sintética, o interesse por insumos naturais voltou a receber a atenção na busca de princípios ativos para a formulação de produtos eficazes e de baixa toxicidade no controle das infecções [20,21]. Diminuir custos no tratamento das infecções e favorecer a população com novas opções de terapia consiste em um grande desafio para a ciência.

Dentre os insumos naturais, as plantas utilizadas na medicina popular representam uma opção promissora para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas [18,22,23]. Plantas, como a *Chenopodium ambrosioides* conhecida popularmente como “mastruz” ou “erva de Santa Maria” tem atraído a atenção de diversos pesquisadores [19,24,25]. O mastruz é uma planta nativa das Américas Central e do Sul com grande distribuição no território brasileiro, tendo relatos de sua utilização na medicina popular para

o tratamento de feridas, corrimento vaginal, processos inflamatórios, anti-helmíntico e antisséptico bucal [26,27]. Estudos prévios comprovaram seu potencial medicinal contra a ação de endoparasitas e fungos [19,28], dentre estes, algumas espécies de *Candida* [25,29]. Foram descritas ainda atividades anti-leishmania [26], ansiolítica, cicatrizante, anti-inflamatória [30,31] e antioxidante [28].

Por seu efeito antimicrobiano [19,25,28,29], e propriedade anti-inflamatória [30,31] pode-se inferir o potencial do mastruz como um método auxiliar no controle da candidose e/ou prevenção de biofilme na superfície de próteses dentais removíveis. Porém, no processo de seleção e indicação de uma substância para o tratamento da candidose, além do efeito da substância no biofilme e nas células do hospedeiro, deve-se considerar o substrato da prótese, ou seja, os efeitos nas propriedades físicas da resina acrílica [9,22]. Sabe-se que dentre as principais desvantagens do uso de substâncias químicas auxiliares para controle do biofilme estão as alterações de cor e rugosidade que estas podem induzir na resina acrílica [8,22]. A modulação da resposta imune do hospedeiro através da atividade anti-inflamatória, a diminuição de biofilme e ausência de efeitos deletérios na resina acrílica justificaria o emprego terapêutico do mastruz em pacientes com candidose e, futuramente, o desenvolvimento de um produto de fácil acesso populacional. Dessa forma, este estudo teve por objetivo investigar *in vitro* o efeito do extrato de mastruz na susceptibilidade em biofilmes de *C. albicans*, o potencial citotóxico, bem como possíveis

alterações na cor e rugosidade da resina acrílica. A hipótese nula é de que o extrato de matruz não produza efeito anti-biofilme, seja tóxico à células do hospedeiro, e altere a rugosidade e cor da resina acrílica.

MATERIAIS E METODOS

Coleta, identificação botânica e preparo de extrato

As folhas de *C. ambrosioides* foram cultivadas no campo experimental da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil. A amostra foi coletada de Junho de 2017 a Novembro de 2017. A exsicata foi preparada e enviada ao Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão para identificação botânica. As folhas foram secas separadamente em uma estufa com circulação de ar de 37°C durante 48 horas, seguidas de trituração em um moinho. O material seco e triturado (aproximadamente 200 g) foi macerado com etanol 70% durante 24 horas, à temperatura ambiente. Este processo foi repetido quatro vezes, e o extrato obtido foi filtrado e depois concentrado utilizando rotaevaporador. O resíduo seco foi diluído em água destilada até uma concentração final de 100 mg/mL, filtrado em membrana de 0,22 µg/mL e mantidos em frascos âmbar até a realização dos experimentos [22].

Caracterização do extrato

Os constituintes químicos do ECA foram analisados por

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando um sistema LC-10AD (Shimadzu, Japão) equipado com um detector de diodos (DAD) e acoplado a um espectrômetro de massas Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics, Alemanha), usando ionização por electrospray (ESI). A separação foi realizada com coluna Phenomenex Kinetex C-18 (250 × 4,6 mm, 5 µm; Torrance, CA, EUA). O ácido fosfórico foi usado como fase móvel A e metanol foi usado como fase móvel B. O gradiente de eluição foi preparado como se segue: 5-20 min de 55 a 10% A, e depois durante 20-30 min de 10 a 0% A. O volume de injeção consistiu de 20 µL de amostra reconstituída e taxa de fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada por um DAD a 470 nm e um método de espectrometria de massa direta (-ESI) com a voltagem mantida em 4,0 kV, fonte de íons de 40 V e temperatura capilar de 320 °C. Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção e massa molecular.

Testes de susceptibilidade (Concentração Inibitória Mínima e Fungicida Mínima)

Para avaliar a susceptibilidade das células planctônicas ao ECA foram realizadas análises de CIM e CFM. Como grupo controle, foi preparada solução de fluconazol, o qual tem sua ação bem estabelecida na literatura [14,22]. Para a reativação do microrganismo e preparo do inóculo, foi utilizada uma cepa de referência *C. albicans* (ATCC 90028). A cepa foi reativada de sua cultura original em placas de ágar Sabouraud dextrose (SDA) a 37°C, por 24 horas. Para preparo do inóculo de *C. albicans*,

colônias foram suspensas em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) enriquecido com 50 mM de glicose. Este conjunto foi incubado por 20 horas, a 37°C e, em seguida, foi centrifugado (5000 rpm, 4°C) e lavado com PBS. Uma alíquota de células centrifugadas foi transferida para um tubo contendo solução salina e a turbidez deste conteúdo foi ajustada com espectrofotômetro, assegurando uma suspensão de $\approx 10^7$ células/mL.

A CIM foi determinada pelo método de micro diluição em caldo preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute [32]. A partir da concentração inicial do ECA, o qual foi definido em testes pilotos, foram feitas diluições seriadas em placas de 96 poços. Os poços contendo as diferentes diluições dos extratos, controles (positivos e negativos) e o inóculo, foram incubados a 37°C por 48 horas. A leitura do teste foi por comparação visual e o CIM correspondeu à menor concentração que impediu o crescimento visível das células planctônicas. Cada concentração do teste anterior que não apresentou crescimento visível foi inoculada em placa de SDA. Após 24 horas de incubação a 37°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM, a menor concentração de extrato que impediu o crescimento fúngico ($\geq 99.9\%$).

Preparo dos discos de resina acrílica

Discos circulares (10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) de resina termopolimerizável a base de PMMA (QC-20, Dentsply Ind e Com Ltda.) foram confeccionados utilizando-se uma mufla de aço

inox contendo orifícios nestas dimensões. Em seguida, os discos foram submetidos a acabamento com lixas d'água n° 320, 400 e 600 em politriz horizontal (Arotec; São Carlos, SP, Brazil). Após, foram armazenados em água destilada a 37°C por 48 horas para eliminação do monômero residual. Para a padronização da rugosidade de superfície, esta foi mensurada com o auxílio de um rugosímetro (Surfcorder SE 1700; Mitutoyo) com o diâmetro da ponta ativa de 2 µm, precisão de 0,01 µm e velocidade de 0,5 mm/s sob pressão de 0,07 N. Foram realizadas três mensurações e a média aritmética calculada, definindo o valor de rugosidade. Foi utilizada como padronização a variação de mais ou menos 5% o valor da média. Após a padronização da rugosidade, os discos foram desinfetados por imersão em hipoclorito de sódio a 1% (HP1%), sob agitação constante, por 3 minutos, e em seguida lavados por 10 minutos com água destilada.

Desenvolvimento e análise dos biofilmes

Para a formação do biofilme, 20 discos de resina acrílica foram alocados em placa de 24 poços e expostos ao inóculo de *C. albicans* previamente ajustado. As placas foram incubadas sob agitação constante, a 37°C, por 90 min, tempo correspondente à fase de adesão celular. Após, os discos foram transferidos para poços contendo meio YNB suplementado com 100 mM e mantidos por 24 horas a 37°C para desenvolvimento do biofilme. Este processo foi repetido até o biofilme completar 48 horas [22].

Completado 48 horas, o biofilme foi imerso por 10 minutos nos seguintes tratamentos: tampão fosfato-salino (PBS, controle negativo), hipoclorito de sódio 1% (HS 1%, controle positivo) ou ECA nas concentrações de CIM ou 5xCIM.

A contagem celular foi realizada através de diluição decimal seriada. Para isto, o biofilme desenvolvido sobre os discos foram sonicados (7 Watts, 30 s) em solução salina para a desagregação celular. A suspensão obtida foi submetida à diluição decimal seriada, e o produto de cada diluição foi inoculado em placas de SDA em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias foram quantificadas visualmente sendo o resultado expresso em células/mL [22].

A atividade metabólica foi realizada pela análise colorimétrica da redução metabólica de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil amino) carbonila]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT). Para isto, os biofilmes foram expostos a solução de XTT e incubados a 37°C por 3 horas. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido e centrifugado (10.000 g, 5 min). A redução do XTT foi determinada pela absorbância registrada em espectrofotômetro (492 nm).

Atividade citotóxica

As linhagens imortalizadas de queratinócitos humanos HaCaT (CLS - Cell Lines Service, número 300493) e fibroblastos murinos NIH-3T3 (ATCC® CRL-1658), foram mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ em atmosfera úmida, e cultivados em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®),

enriquecido com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina.

O procedimento adotado foi desenvolvido com base na literatura [33]. Basicamente, o teste consistiu na inoculação dos queratinócitos (100µL/poço, 4x10⁴ células/mL) e fibroblastos (100 µL/poço; 3x10⁴ células/mL) em placas de 96 poços e incubação em estufa (37 °C, 5% CO₂, atmosfera úmida) por 24 h (período de adesão celular). Posteriormente, todo o meio de cultura foi removido e as células foram expostas ao ECA nas concentrações de CIM, 5xCIM e 10xCIM por 24 h e 48 h. Poços contendo células sem ECA foram utilizados como controle.

O crescimento e viabilidade celular foi avaliado através do método colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Para isto, todo o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução salina para a introdução de novo meio de cultura DMEM/SFB acrescido de MTT (0.5%). As placas foram incubadas por 4 h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂) protegidas da luz. Após este período, o meio foi removido e adicionou-se dimetilsulfóxido 100% (DMSO) para a solubilização do corante permitindo leitura óptica a 550 nm. A partir dos valores de absorbância foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular, considerando: %Viabilidade = TA / T1 x 100, sendo TA a média da absorbância da célula tratada (absorbância do branco da amostra) e T1 a absorbância da suspensão celular sem tratamento.

Efeito sobre a resina acrílica

Um total de 20 discos foram imersos em (1) água destilada (controle negativo), (2) HS1% (controle positivo) ou (3) ECA na (4) CIM ou 5xCIM. Os discos foram incubados a 37°C durante 28 dias. O meio de imersão foi trocado diariamente e os discos sempre mantidos com a mesma superfície submetida a acabamento voltada para cima. Após, os discos foram lavados em água destilada e secos em papel absorvente. Os testes foram realizados após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão [22].

Avaliação de cor:

Discos foram colocados sob um molde de silicone com um orifício, com o objetivo de adaptar um espectrofotômetro portátil (EasyShade Advance 4.0; Wilcos, Alemanha). Este molde foi utilizado a fim de proporcionar o reposicionamento preciso e medição da cor da superfície do disco. As medições de cor foram obtidas usando o sistema CIEL*a*b*. A alteração de cor total (ΔE) foi calculada a partir da seguinte equação: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]$. Valores de $\Delta E < 3.7$ foram considerados como clinicamente imperceptíveis [34].

Avaliação de rugosidade:

Para a análise da rugosidade de superfície, em cada discos foram realizadas três leituras em rugosímetro (Surfcorder SE 1700; Mitutoyo). A rugosidade de cada disco foi calculada pela média aritmética (μm). A alteração da rugosidade de superfície (ΔR_a) foi

obtida pela diferença entre a rugosidade após imersão e valores iniciais de rugosidade (*baseline*).

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo software SAS/LAB (SAS Software, versão 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A distribuição normal dos dados foi previamente ajustada e, quando necessário, os dados foram transformados conforme sugerido pelo software. Os dados referentes à contagem de células, atividade metabólica e viabilidade de queratinócitos e fibroblastos foram analisados pelo teste ANOVA one-way seguido do teste de Tukey, no qual o tratamento por imersão foi tratado como fator de estudo. Os dados de alteração de cor e rugosidade de superfície foram analisados por ANOVA two-way para medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey, no qual os períodos de tratamento e o tipo de imersão foram considerados fatores de estudo. O nível de significância foi estabelecido em 5% para todos os testes.

RESULTADOS

Caracterização do extrato

Foi possível identificar 16 destes componentes baseado nos seus tempos de retenção e padrão de massa molecular. O compostos detectados em maior abundância foram o kaempferol e a quercetina, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos compostos obtidos após a caracterização química do *C. ambrosioides* por CLAE.

	[M-H]	MSⁿ	Compound
1	285	257	Kaempferol
2	313	295	3',4'-dimethoxyluteolin
3	363	295; 277; 171	NI ^a
4	387	163	p- coumaroyl acid derivative
5	391	387;163	p- coumaroyl acid derivative
6	295	162	NI ^a
7	301	285; 267; 241; 173	Hesperetin
8	431	385; 285; 152	Kaempferol-3-O-alfa-L-raminosideo
9	433	387; 295	narirutin
10	463	301	Quercetina-3-O-glicosideo
11	495	431; 343	Digalloyl quinic acid
12	499	431; 421; 385; 285	3,4-O-(E)-p-coumaroylcaffeoylquinic acid
13	531	417; 285	NI ^a
14	563	431;285; 151	Kaempferol-O-ramosideo-pentósídeo
15	577	431;285	Kaempferol dirhamnoside-O-pentoside
16	579	447; 301	Naringin
17	593	285	Kaempferol-3-Glucoside-3 " -Rhamnoside
18	595	301; 151	Quercetina-3-O-arabinoglucosideo
19	613	591	NI ^a
20	623	447; 301	Quercetin (acyl) glucoronide-o-rhaminoside
21	695	593; 549; 430; 285	NI ^a

^aNão Identificado

Testes de susceptibilidade

Tanto a CIM como a CFM do ECA observadas para as células planctônicas de *C. albicans* obtiveram o valor de 0.25 mg/mL, demonstrando um padrão de comportamento fungicida. Os valores de fluconazol foram 0,5 µg/mL e > 64 µg/mL para CIM e CFM, respectivamente.

Análise em biofilmes

Para os biofilmes de *C. albicans*, a exposição no ECA por 10 minutos teve efeito significativo, reduzindo a contagem de células quando comparado ao controle negativo ($p = 0.001$; Figura 1). O ECA na CIM foi suficiente para reduzir aproximadamente 80% das células do biofilme ($p < 0.0001$), enquanto na 5xCIM alcançou quase uma completa erradicação do biofilme (> 99%), semelhante ao resultado obtido com HS1% (controle positivo, $p > 0.05$). Considerando os resultados da atividade metabólica, observou-se que também houve diferença entre controle negativo e ECA na CIM ($p > 0.05$), e na 5xCIM esta atividade foi reduzida para níveis muito próximos ao HS1% ($p = 0.001$, Figura 2).

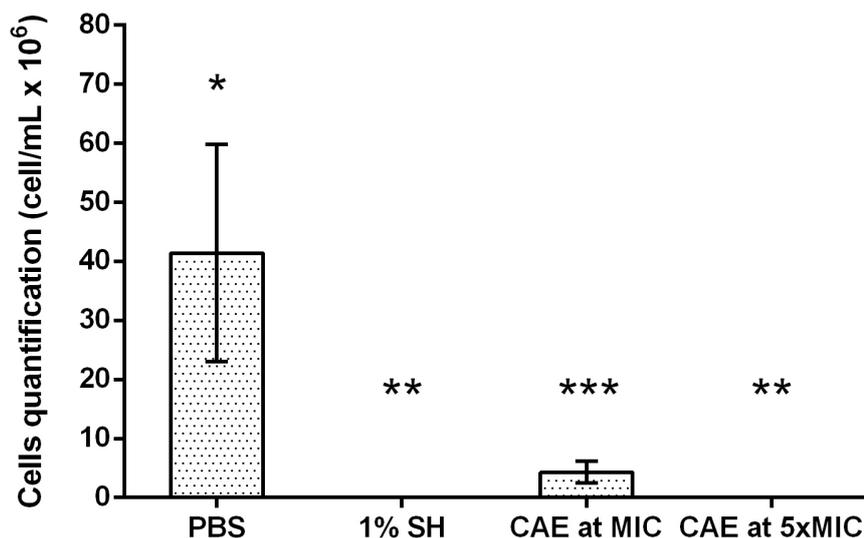


Figura 1. Efeito do ECA na contagem de células do biofilme de *C. albicans*. Símbolos distintos (*, **, ***) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey, $p < 0.05$).

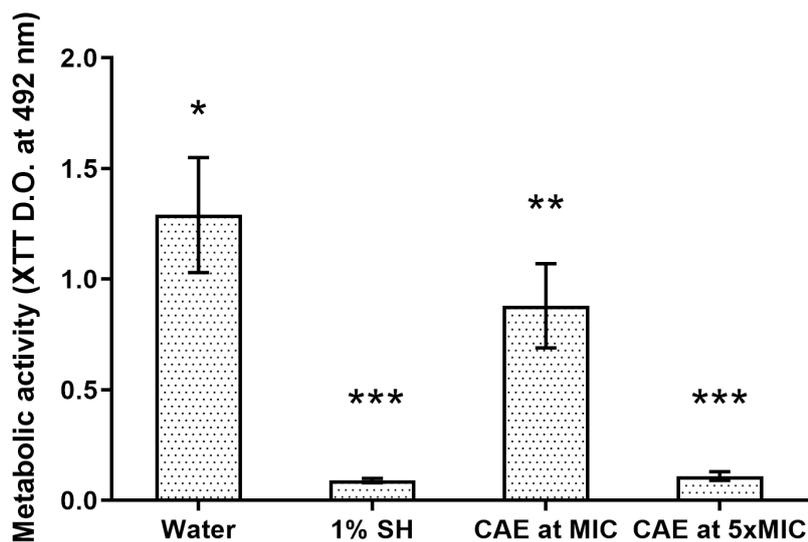


Figura 2. Efeito do ECA na atividade metabólica do biofilme de *C. albicans*. Símbolos distintos (*, **, ***) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey, $p < 0.05$).

Atividade citotóxica

Tanto durante o período de 24 horas, quanto após 48 horas, queratinócitos e fibroblastos expostos ao ECA nas concentrações de CIM e 5xCIM apresentaram viabilidade celular similar ao grupo controle, não havendo diferença estatística entre estes ($p > 0.05$, Figure 3). A exposição ao ECA à concentração de 10xCIM foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de ambos os tipos celulares quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$, Figure 3).

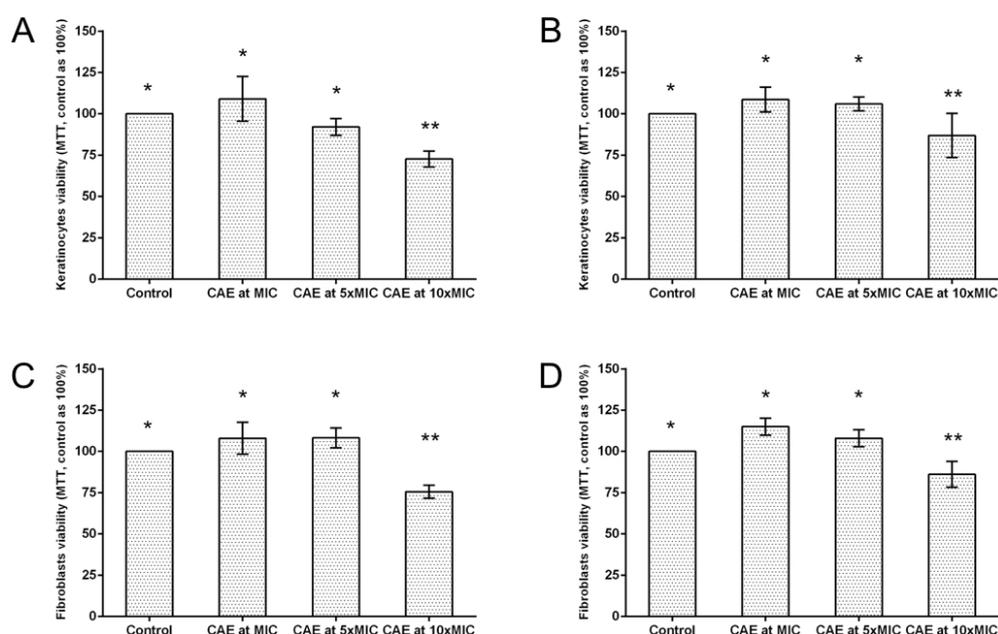


Figura 3. Atividade citotóxica do ECA em queratinócitos em diferentes concentrações após (A) 24 horas e (B) 48 horas de exposição. Atividade citotóxica do ECA em fibroblastos em diferentes concentrações após (C) 24 horas e (D) 48 horas de exposição. Símbolos distintos (*, ** ou ***) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey, $p < 0.05$).

Efeitos sobre a resina acrílica

Considerando os valores de alteração de cor (ΔE), quando comparado ao grupo com água destilada foram observadas diferenças estatísticas tanto para as imersões em HS1% quanto no ECA, em todos os tempos de imersão ($p < 0.05$). Apesar desta variação, todos os valores de ΔE obtidos nas imersões no ECA foram inferiores que 3,7. Em contrapartida, alterações clinicamente perceptíveis foram detectadas no grupo com HS1% a partir do 21º dia de imersão ($p < 0.05$, Tabela 2). Quanto aos valores de rugosidade de superfície, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo com água destilada e o ECA na CIM ou 5xCIM ($p > 0.05$, Tabela 3). Alterações significativas na rugosidade foram detectadas apenas no grupo HS1% após 28 dias de imersão ($p < 0.05$).

Tabela 2. Alteração de cor (ΔE) da resina acrílica após a imersão em ECA em diferentes intervalos de tempo (média \pm desvio-padrão, n = 9).

Grupo	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Água destilada	1.09 \pm 0.33 (A,a)	1.45 \pm 0.27 (A,a)	1.54 \pm 0.51 (A,a)	1.60 \pm 0.24 (A,a)
HS 1%	3.12 \pm 0.52 (B,a)	3.22 \pm 0.87 (B,a)	3.89 \pm 0.58 (B,b)	4.05 \pm 0.99 (B,b)
ECA na CIM	2.46 \pm 0.38 (C,a)	2.41 \pm 0.56 (C,a)	2.53 \pm 0.69 (C,a)	2.79 \pm 0.76 (C,a)
ECA na 5xCIM	2.42 \pm 0.45 (C,a)	2.70 \pm 0.61 (C,a)	2.88 \pm 0.77 (C,a)	3.13 \pm 0.57 (C,b)

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo tempo de imersão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de imersão de um mesmo grupo (ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Tukey, $p < 0.05$).

Tabela 3. Alteração da rugosidade de superfície (ΔRa) da resina acrílica após a imersão em ECA em diferentes intervalos de tempo (média \pm desvio-padrão, n = 9).

Grupo	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Água	0.09 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04
destilada	(A,a)	(A,a)	(A,a)	(A,a)
HS 1%	0.10 \pm 0.03	0.14 \pm 0.09	0.25 \pm 0.06	0.27 \pm 0.07
	(A,a)	(A,a)	(B,b)	(B,b)
ECA na CIM	0.09 \pm 0.03	0.10 \pm 0.04	0.13 \pm 0.03	0.13 \pm 0.05
	(A,a)	(A,a)	(A,a)	(A,a)
ECA na	0.08 \pm 0.02	0.13 \pm 0.05	0.14 \pm 0.07	0.14 \pm 0.09
5xCIM	(A,a)	(A,a)	(A,a)	(A,a)

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo tempo de imersão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de imersão de um mesmo grupo (ANOVA de medidas repetidas seguida por teste de Tukey, $p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Sabe-se que as plantas utilizadas na medicina popular representam uma opção promissora para a prevenção e tratamento de infecções [18,22,23]. Em 2009, o Ministério da Saúde do Brasil elaborou a Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse no Sistema de Saúde (RENISUS) que incentiva a pesquisa de plantas medicinais amplamente utilizadas na população brasileira, e a *C. ambrosioides* L. integra esta lista [35], motivando assim a identificação dos seus compostos e das suas atividades biológicas. Neste estudo, foi investigado pela primeira vez na literatura o efeito do extrato de *C. ambrosioides* em biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos em resina acrílica, simulando uma condição de biofilme na superfície de uma prótese dental removível. Na tentativa de avaliar o potencial desta planta como um método auxiliar no controle da candidose associada à prótese, foi avaliado o efeito anti-biofilme, o efeito tóxico em queratinócitos e fibroblastos, bem como possíveis efeitos deletérios que o ECA poderia ocasionar no substrato da resina acrílica.

Através da caracterização química do ECA foi possível identificar a maior presença dos compostos kaempferol e quercetina, compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides [19,36,37]. Os flavonóides apresentam diversas atividades farmacológicas, entre estas, potencial antimicrobiano e antioxidante. Estes compostos estão relacionados com a inativação de enzimas responsáveis pela adesão celular, o que provavelmente funciona

como seu mecanismo de ação antimicrobiana [38]. Além disso, sabe-se que os flavonóides têm potente ação antioxidante, o que explica sua capacidade de regular o sistema imune [39]. A quercetina e o kaempferol já tiveram sua atividade antimicrobiana atestada contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Protteus mirabilis* e *C. albicans* [40,41].

Como ponto de partida para os testes em *C. albicans*, foi investigado a susceptibilidade das células planctônicas ao ECA. Através deste teste, foram observados valores coincidentes de CIM e CFM (i.e. 0.25 mg/mL ou 250 µg/mL), evidenciando o potencial fungicida do extrato. Considerando os valores de CIM, existe uma classificação na literatura para a atividade antimicrobiana de produtos naturais que considera: inibidores fortes para valores de CIM <100 µg/mL, inibidores moderados para valores entre 100 e 500 µg/mL, inibidores fracos para valores entre 500 and 1000 µg/mL, e ausência de atividade para valores > 1000 µg/mL [42]. Assim, segundo este critério, o ECA pode ser considerado um inibidor moderado, o que, em partes, justifica os bons resultados obtidos nos demais testes realizados [19,29].

É importante ressaltar que os valores de CIM são obtidos em testes que avaliam a *C. albicans* em sua forma planctônica. Na cavidade oral, em especial, na superfície da prótese, estas células estão organizadas em biofilmes que, por sua complexidade estrutural, são relativamente mais resistentes à atuação de agentes antifúngicos [16]. Neste estudo, o efeito antifúngico do ECA foi

avaliado em biofilmes de *C. albicans* maduros (i.e. 48 horas de desenvolvimento), e o tempo de imersão de 10 minutos foi escolhido em função do tempo recomendado de imersão para o grupo controle positivo, o HS1% [8,9].

Para o biofilme de *C. albicans*, foi possível observar que 10 minutos de imersão no ECA na CIM foi suficiente para reduzir o número de células do biofilme comparado ao grupo controle negativo. Estes resultados podem ser atribuídos à presença da quercetina e do kaempferol na sua composição química, os quais apresentam potencial antifúngico reconhecido [38, 43-46]. Além de interferir diretamente no primeiro mecanismo de virulência do fungo, ou seja, a adesão celular [38], estes compostos também podem impedir o transporte de proteínas e ocasionar a ruptura da célula fúngica [45]. A redução da atividade metabólica dos biofilmes expostos ao ECA, como demonstrado no ensaio de XTT, pode ser diretamente atribuído como consequência da redução do número de células viáveis, os quais geralmente seguem um padrão proporcional [47].

Uma grande redução da viabilidade e atividade fúngica foi observada nos biofilmes expostos ao ECA na 5xCIM, apresentando uma tendência fungicida similar ao que foi encontrado no grupo com HS 1%. Tais resultados podem ser consequência da desagregação das células e inibição da capacidade de aderência celular. Ainda, é possível que a redução da atividade metabólica possa ter ocorrido devido ao estresse intracelular decorrente da ação do extrato quando em maior concentração [46].

Considerando que a prótese dental permanece em íntimo contato com os epitélios orais, é de suma importância avaliar os possíveis efeitos tóxicos do ECA nestes tipos celulares, garantindo segurança em futuros estudos clínicos. De acordo com a International Standard Organization (ISO 10993-5) [48], concentrações que mantêm a viabilidade celular menor que 70% podem ser consideradas como citotóxicos. Neste estudo, foi observado que, mesmo após 48 horas de exposição, queratinócitos e fibroblastos expostos ao ECA na CIM e 5xCIM apresentaram viabilidade celular similar ao grupo controle com PBS, um tampão reconhecido por ser atóxico em células humanas por sua capacidade osmorreguladora. Por outro lado, foi observado que a concentração de 10xCIM apresentou redução da viabilidade a níveis considerados tóxicos, e por isso esta concentração foi excluída dos demais testes empregados neste estudo. Assim, de acordo com estes resultados, as concentrações testadas apresentaram potencial antifúngico sem resultar em danos significativos às células do hospedeiro.

Tem sido demonstrado que as principais desvantagens do uso de substâncias químicas auxiliares para controle do biofilme estão as alterações de cor e rugosidade que estas podem induzir na resina acrílica, o que está diretamente relacionado à longevidade e estética da prótese dental [5,8,22].

Neste estudo, a alteração de cor foi investigada pelo sistema colorimétrico CIEL*a*b*, um sistema tridimensional uniforme que tem sido amplamente utilizado para determinar as diferenças cromáticas

traduzindo suas combinações em dados matemáticos [8,22]. Neste sistema, a alteração de cor (ΔE) é definida como a mudança de cor relativa entre avaliações de cores repetidas. Considerando que os valores de $\Delta E < 3,7$ são considerados como clinicamente imperceptíveis [34], o ECA não causou uma alteração de cor significativa na resina acrílica mesmo após 28 dias de imersão.

Possivelmente, o ECA não induziu interações químicas com a superfície da resina acrílica a ponto de degradar sua matriz orgânica e resultar em manchamento, o que provavelmente ocorreu com o grupo HS1% a partir do 21º dia. Apesar das concentrações investigadas serem visivelmente da cor verde, especula-se que suas moléculas cromogênicas sejam grandes o suficiente para apenas se depositarem na superfície da resina. Como a solução de imersão era trocada diariamente, acredita-se que a cada troca estas moléculas mais densas eram lavadas e, por isso, não ocasionaram qualquer alteração de cor visível.

O efeito da água sobre a propriedade de cor das resinas acrílicas são relevantes do ponto de vista clínico, uma vez que a recomendação da imersão da prótese em água durante o período noturno (imersões “overnight”) é frequente. Porém, no tempo investigado não foi possível identificar qualquer alteração.

Da mesma forma, o ECA não induziu mudanças significativas na rugosidade quando comparado ao grupo controle negativo com água destilada. Sabendo que a rugosidade é um fator crucial para a adesão de microrganismos na superfície acrílica, é de suma importância que as soluções químicas não alterem tal

propriedade, uma vez que superfícies rugosas podem favorecer a formação de biofilmes [5]. Dentre as soluções para controle químico do biofilme, o HS1% empregado em um protocolo de imersão por 10 minutos é considerada a mais eficiente [8,49,50]. Apesar destes bons resultados, quando em regime prolongado, é capaz de degradar a matriz da resina acrílica ocasionando um efeito “clareador” e aumentar a porosidade da sua superfície [49], como confirmado no presente estudo.

Embora 28 dias de imersão da resina no ECA pareça ser um curto período de tempo em comparação com a vida útil de uma prótese dental, entende-se que a exposição constante à solução a qual foi modificada todos os dias, pode envelhecer significativamente a matriz acrílica, criando uma situação desafiadora para o material testado.

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que o mastruz é uma possível fonte de substâncias bioativas que podem ser utilizadas futuramente na formulação de produtos que auxiliem o controle da candidose associada ao uso de próteses dentais.

CONCLUSÃO

A imersão da resina acrílica para prótese dental em extrato de *C. ambrosioides* (ECA) na sua concentração inibitória mínima foi efetiva na redução de biofilmes de *C. albicans* sem evidências de efeitos citotóxicos ou alteração da rugosidade e cor deste substrato.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro (PAEDT-36-2014 e UNIVERSAL-604-14).

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse com relação à autoria e/ou publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. Gad MM, Fouda SM, Al-Harbi FA, Napankangas R, Raustia A. PMMA denture base material enhancement: a review of fiber, filler, and nanofiller addition. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3801-3812.
2. Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J*. 2017;6(4):46-51.
3. Gleiznys A, Zdanaviciene E, Zilinskas J. Candida albicans importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015;17(2):54-66.

4. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanita PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. Braz Dent J. 2012;23(5):547-554.
5. Paranhos HF, Salles AE, Macedo LD, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Watanabe E. Complete denture biofilm after brushing with specific denture paste, neutral soap and artificial saliva. Braz Dent J. 2013;24(1):47-52.
6. Padilha DM, Hugo FN, Hilgert JB, Dal Moro RG. Hand function and oral hygiene in older institutionalized Brazilians. J Am Geriatr Soc. 2007;55(9):1333-1338.
7. Gantait S, Bhattacharyya J, Das S, Biswas S, Ghatai A, Ghosh S, et al. Comparative assessment of the effectiveness of different cleaning methods on the growth of *Candida albicans* over acrylic surface. Contemp Clin Dent. 2016;7(3):336-342.
8. Sousa-Porta SR, de Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Evaluation of sodium hypochlorite as a denture cleanser: a clinical study. Gerodontology. 2013;12.
9. Arruda CNF, Salles MM, Badaro MM, Sorgini DB, Oliveira VC, Macedo AP, et al. Evaluation of biofilm removal and adverse effects on acrylic resin by diluted concentrations of sodium

hypochlorite and *Ricinus communis* solutions. Gerodontology. 2018.

10. Salloum AM. Effect of 5.25 % sodium hypochlorite on color stability of acrylic and silicone based soft liners and a denture base acrylic resin. J Indian Prosthodont Soc. 2014;14(2):179-186.
11. Jose A, Coco BJ, Milligan S, Young B, Lappin DF, Bagg J, et al. Reducing the incidence of denture stomatitis: are denture cleansers sufficient? J Prosthodont. 2010;19(4):252-257.
12. Lucena-Ferreira SC, Cavalcanti IM, Cury AA. Efficacy of denture cleansers in reducing microbial counts from removable partial dentures: a short-term clinical evaluation. Braz Dent J. 2013;24(4):353-356.
13. Lucena-Ferreira SC, Ricomini-Filho AP, da Silva WJ, Cury JA, Del Bel Cury AA. Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm. Clin Oral Investig. 2014; 4.
14. Di Stasio D, Lauritano D, Minervini G, Paparella RS, Petruzzi M, Romano A, et al. Management of denture stomatitis: a narrative review. J Biol Regul Homeost Agents. 2018;32(2 Suppl.1):113-116.

15. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*. 2010; 98(1):15-25.
16. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of Candida biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1325-1337.
17. Nett JE. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting Candida. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(3):375-382.
18. Vieira DR, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR, Liberio SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J Ethnopharmacol*. 2014;155(3):1441-1449.
19. Jesus RS, Piana M, Freitas RB, Brum TF, Alves CFS, Belke BV, Mossmann NJ, Cruz RC, Santos RCV, Dalmolin TV, Bianchini BV, Campos MMA, Bauermann LF. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Braz J Microbiol*. 2018;49(2):296-302.
20. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):80-84.

21. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):305-311.
22. Madeira PL, Carvalho LT, Paschoal MA, de Sousa EM, Moffa EB, da Silva MA, et al. In vitro Effects of Lemongrass Extract on *Candida albicans* Biofilms, Human Cells Viability, and Denture Surface. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:71.
23. Goncalves L, Tavares AS, Costa FS, Diniz RS, Galvao LCC, Sousa EM, Paschoal MAB. Effects of *Terminalia catappa* Linn. Extract on *Candida albicans* biofilms developed on denture acrylic resin discs. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(7):e642-e647.
24. Shah H, Khan AA. Phytochemical characterisation of an important medicinal plant, *Chenopodium ambrosioides* Linn. *Nat Prod Res.* 2017;31(19):2321-2324.
25. Jardim CM, Jham GN, Dhingra O, Freire MM. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Braz Chem Soc.* 2010;21:1814-1818.
26. De Queiroz AC, Dias Tde L, Da Matta CB, Cavalcante Silva LH, de Araujo-Junior JX, de Araujo GB, et al. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil.

Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:478290.

27. Bieski IG, Leonti M, Arnason JT, Ferrier J, Rapinski M, Violante IM, et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2015;173:383-423.
28. Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(2):159-164.
29. Chekem MS, Lunga PK, Tamokou JD, Kuate JR, Tane P, Vilarem G. Antifungal Properties of *Chenopodium ambrosioides* Essential Oil Against *Candida* Species. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(9):2900-2909.
30. Trivellato Grassi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Buss Zda S, Monguilhott ED, Frode TS, et al. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J Ethnopharmacol.* 2013;145(1):127-138.
31. Penha ESD, Lacerda-Santos R, Carvalho MGF, Oliveira PT. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the in vivo bone tissue. *Microsc Res Tech.* 2017;80(11):1167-

1173.

32. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A3. CLSI, Pennsylvania, USA, 2008.
33. Jorge MP, Madjarof C, Ruiz ALTG, Fernandes AT, Rodrigues RAF, Souza IMO, Foglio MA, Carvalho JE. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *J Ethnopharmacol.* 2008;118(3):361-366.
34. Moon A, Powers JM, Kiat-Amnuay S. Color stability of denture teeth and acrylic base resin subjected daily to various consumer cleansers. *J Esthet Restor Dent.* 2014;26:247-255.
35. Brasil, Ministério da Saúde Organização Mundial da Saúde. 392 Available from: 393 [http://bvsmssaudegovbr/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plan](http://bvsmssaudegovbr/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plan_tas_medicinais_sus_0603pdf) 394 [tas_medicinais_sus_0603pdf](http://bvsmssaudegovbr/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plan_tas_medicinais_sus_0603pdf), 2009.
36. Gupta B, Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical and molecular characterization. *Int J Genomics.* 2014;2014: ID701596.
37. Nedialkova ZK, Nedialkov PT, Nikolov SD. The genus 381 *Chenopodium*: phytochemistry ethnopharmacology and 382 46

pharmacology. *Pharmacogn Rev.* 2009;3(6):280-306.

38. Silva MJD, Endo LH, Dias ALT, Silva GA, Santos MH, Silva MA. Assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of the organic extracts and fractions of *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). *Rev Cienc Farm Básica Apl.* 2012;33(2):267-274.
39. Vezza T, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Utrilla MP, Rodríguez-Cabezas ME, Galvez J. Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review. *Nutrients.* 2016;8(4):211.
40. Rashed K, Butnariu M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Bauhinia racemosa* Lam. and chemical content. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(3):1073-1080.
41. Singh G, Passsari AK, Leo VV, Mishra VK, Subbarayan S, Singh BP. Evaluation of phenolic content variability along with antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic potential of selected traditional medicinal plants from India. *Front Plant Sci.* 2016;7:407.
42. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1027-1031.
43. Tatsimo SJ, Tamokou JD, Havyarimana L, Csupor D, Forgo P,

Hohmann J. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res Notes*. 2012;5(1):158.

44. Pinho E, Ferreira IC, Barros L, Carvalho AM, Soares G, Henriques M.. Antibacterial potential of northeastern Portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds. *BioMed Res Int*. 2014;2014:ID814590.

45. Alavarce RAS, Saldanha LL, Almeida NLM, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The beneficial effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* biofilm formation: new approaches to denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:ID939625.

46. Almeida CM, Lima RF, Costa TKVLD, Sousa IMO, Cabral EC, Basting RT, Torre AD, Cavalcanti YW, Rosalen PL, Duarte MCT, Ruiz ALTG, Foglio MA, Godoy GP, Costa EMMB. Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. *Braz Oral Res*. 2018;24;32:e41.

47. Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94(1):149-156.

48. ISO - 10993-5, International Standard Organization. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3rd ed. Geneva: International Standard Organization, 2009.
49. Lima EMCS, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007;33:356-362.
50. Rossato MB, Unfer B, May LG, Braun KO. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. *Oral Health Prev Dent.* 2011;9:221-227.