

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ROBERTA CARVALHO SHEL BALLIANA

**Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos
buciais em *Candida albicans***

VITÓRIA
2012

ROBERTA CARVALHO SHEL BALLIANA

**Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos
buciais em *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariceli Lamas de Araújo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Cláudia Masrouah Jamal

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B192a Balliana, Roberta Carvalho Sthel, 1975-
Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e
antissépticos bucais em *Candida albicans* / Roberta Carvalho
Sthel Balliana. - 2012.
82 f. : il.

Orientador: Mariceli Lamas de Araújo.
Coorientador: Cláudia Masrouah Jamal.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. *Candida albicans*. 2. Antissépticos bucais. 3. Plantas
medicinais. 4. Biofilme. I. Araújo, Mariceli Lamas de. II. Jamal,
Claudia Masrouah. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



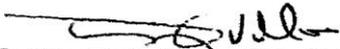
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

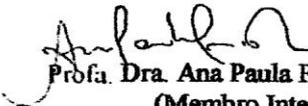
**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

A mestranda ROBERTA CARVALHO STHEL BALLIANA apresentou a dissertação intitulada “Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos bucais em *Candida albicans*” em sessão pública, no dia 10 de agosto de 2012, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

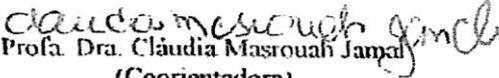
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) aprovar () reprovar a dissertação para habilitar a farmacêutica ROBERTA CARVALHO STHEL BALLIANA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 10 de agosto de 2012


Profa. Dra. Tânia Regina Grão Velloso
(Membro Externo)


Profa. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
(Membro Interno)


Profa. Dra. Mariceli Lamas de Araújo
(Orientadora)


Profa. Dra. Cláudia Masrouah Jampal
(Coorientadora)

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força para superar os obstáculos que muitas vezes me desanimaram e por outro lado, só aumentaram a minha fé.

Aos meus pais, por todos os esforços na minha educação para que eu pudesse alcançar meus ideais; a toda minha família pelo apoio e torcida. E ao meu querido esposo Eduardo, por compartilhar todos os momentos durante esta jornada de estudos e renúncias pessoais.

À professora Dr^a Mariceli, pela oportunidade que me proporcionou, e principalmente pela confiança depositada no desenvolvimento deste trabalho.

A professora Dr^a Cláudia pela orientação no preparo dos extratos vegetais e por seu grande apoio durante a apresentação deste trabalho.

À Simone, farmacêutica-bioquímica do Laboratório de Micologia da UFES, que esteve sempre disposta, paciente e atenciosa para explicar e buscar soluções diante de minhas dúvidas. Agradeço imensamente a sua ajuda.

À amiga Juliana Carnielli, que contribuiu de forma especial com sua infinita bondade, tranquilidade e desprendimento.

Às amigas Flávia e Adrielle, que compartilharam comigo experiências, preocupações e conquistas, sempre com bom humor e alegria. E aos colegas de laboratório Aline, Mariane e Mauro por toda colaboração prestada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, por sua dedicação a um trabalho tão valioso como educadores e pesquisadores.

Muito obrigada!

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmo lugares.

É tempo de travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado sempre à margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

RESUMO

Leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos e *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente associada a essas infecções. A candidíase oral se destaca pela alta incidência e pelo uso frequente de drogas antifúngicas, o que pode levar à ocorrência de resistência e falência no tratamento da infecção. Há uma constante necessidade de pesquisas sobre novos agentes para a profilaxia e tratamento eficaz da candidíase oral. O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do potencial efeito antifúngico de extratos das plantas *Gossypium hirsutum* L., *Arctium lappa*, *Equisetum* sp., *Cecropia pachystachya* Trécul. e *Pogostemon heyneanus* sobre células não aderidas de *Candida albicans* e a avaliação do efeito dos antissépticos bucais Cepacol® Cool Ice, Listerine® Cool Mint, Periogard® e Plax® Whitening sobre células não aderidas e biofilmes de *Candida albicans*. As metodologias utilizadas basearam-se na avaliação da susceptibilidade de isolados clínicos de *C. albicans* através da determinação da inibição de crescimento celular por turbidimetria e por determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). Os resultados obtidos nos testes com células não aderidas revelaram-se promissores com extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul., com valores de CIM entre 7,81 e 3,91 µg/mL. Os antissépticos Cepacol® e Periogard® apresentaram os menores valores de CIM, entre 0,20 e 0,10%; Plax® Whitening variou entre 1,56% e 0,39% e Listerine® apresentou valores entre 6,25% e 0,39%. As diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) revelaram que os antissépticos Cepacol® Cool Ice e Periogard® apresentaram os melhores resultados. Em relação a inibição de formação de biofilmes, os valores de CIM encontrados foram similares para os antissépticos testados, variando de 50% a 0,20%, sem diferenças estatísticas entre estes (Kruskal-Wallis, $p = 0,6915$).

Palavras-chave: *Candida albicans*; antissépticos bucais; extratos vegetais; atividade antifúngica; biofilme

ABSTRACT

Yeasts are opportunistic fungi responsible for most fungal infections in humans and *Candida albicans* is the most often species associated with these infections. Oral candidiasis is distinguished by high impact and by the frequent use of antifungal drugs, which can lead to the occurrence of resistance and treatment failure for this infection. There is a constant need for research about new agents for the prophylaxis and effective treatment of oral candidiasis. The main objective of this study was to evaluate the potential antifungal effect of extracts of plants *Gossypium hirsutum* L., *Arctium lappa*, *Equisetum* sp. *Cecropia pachystachya* Trécul. and *Pogostemon heyneanus* against not adhered cells and biofilm of *Candida albicans* and evaluation of the effect of the mouthwash Cepacol® Ice Cool, Cool Mint Listerine®, Periogard® and Plax® Whitening against not adhered cells and biofilms of *Candida albicans*. The methods used were based on inhibition of cell growth by turbidimetry and for determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of clinical isolates of *C. albicans*. The results obtained in tests with non-adherent cells were promising with extracts of *Cecropia pachystachya* Trécul., presenting MIC values between 7.81 and 3.91 mg / mL. The antiseptic Periogard Cepacol® had the lowest MIC values, between 0.20 and 0.10%; Plax Whitening® ranged between 1.56% and 0.39% and Listerine® showed values between 6.25% and 0,39%. Statistical differences (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$) revealed that the mouthwashes Cepacol® Cool Ice and Periogard® showed the best results. Regarding the inhibition of biofilm formation, the mouthwashes MICs were similar, ranging between 50% and 0.20%, with no statistical differences between among them (Kruskal-Wallis test, $p = 0.6915$).

Keywords: *Candida albicans*; mouthwash; extracts; antifungal activity; biofilm

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Plantas selecionadas.....38

Tabela 2 – Antissépticos bucais utilizados nos testes.....40

Tabela 3 – Rendimento dos extratos brutos das espécies avaliadas.....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Candida albicans</i> na forma de levedura.....	19
Figura 2 – Hifas verdadeiras (*) e pseudo-hifas (+) de <i>Candida albicans</i>	19
Figura 3 – Formas clínicas da candidíase oral.....	24
Figura 4 – Representação microscópica (1000X) de células de <i>Candida albicans</i> aderidas sobre a superfície de uma prótese.....	25
Figura 5 – Espécies vegetais selecionadas.....	36
Figura 6 – Extratos brutos das plantas selecionadas.....	39
Figura 7 – Diluição 1 (D1) dos extratos.....	40
Figura 8 – Distribuição e concentração final dos extratos nas microplacas.....	43
Figura 9 – Distribuição e concentração final dos antissépticos nas microplacas.....	44
Figura 10 – Distribuição e concentração final dos antissépticos nas microplacas (ensaio de inibição de formação de biofilme).....	46
Figura 11 – Valores de CIM (em µg/mL) dos extratos.....	48
Figura 12 – Valores de CIM (%) dos antissépticos bucais.....	49
Figura 13 – Isolados clínicos de <i>C. albicans</i> produtores de biofilme.....	50
Figura 14 – Cepacol® Cool Ice.....	51

Figura 15 – Listerine® Cool Mint.....	51
Figura 16 – Periogard®.....	52
Figura 17 – Plax® Whitening.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DO – Densidade óptica

et al. - e outros

EUA – Estados Unidos da América

HIV – Human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)

HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

MOPS– 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (Ácido N-morfolino propanosulfônico)

NaCl – Cloreto de sódio

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salina)

pH – Potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

YPD – Yeast Peptone Dextrose

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

= – igual a

< – menor que

± – mais ou menos

°C – Graus Celsius

mg/ mL – miligrama por mililitro

µg/ mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

W – Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 O Gênero <i>Candida</i>	21
3.2 Candidíase oral.....	24
3.3 Biofilmes.....	27
3.4 Tratamento da Candidíase Oral	30
3.4.1 Antifúngicos.....	30
3.4.2 Enxaguatórios bucais antissépticos	31
3.4.3 Estratégias para controle de biofilmes orais	33
3.5 Métodos de estudo de biofilmes.....	34
3.6 Plantas medicinais.....	35
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Plantas	41
4.1.1 Identificação e coleta	41
4.1.2 Obtenção dos extratos brutos.....	42
4.1.3 Diluição dos extratos.....	42
4.2 Antissépticos bucais	43
4.3 Meios de Cultura.....	44
4.4 Microrganismos.....	44
4.5 Atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos bucais (baseado no método de microdiluição em caldo - Documento M27-A3, CLSI, 2008)	44
4.5.1 Preparo do inóculo	44
4.5.2 Extratos vegetais.....	45
4.5.3 Antissépticos bucais	46
4.6 Biofilme	47
4.6.1 Preparo do inóculo	47
4.6.2 Formação de biofilme	48
4.6.3 Ensaio de inibição de formação de biofilme com antissépticos bucais	48

4.7. Análise dos dados	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Massa dos extratos obtidos.....	50
5.2 Testes de microdiluição	50
5.2.1 Atividade antifúngica (CIM - µg/mL) de extratos e antissépticos.....	50
5.3 Biofilme	52
5.3.1 Formação e quantificação de biofilme	52
5.3.2 Inibição de formação de biofilme	53
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS	65
9 ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por fungos em seres humanos sofreu um grande aumento, especialmente em indivíduos com o sistema imunitário comprometido. As leveduras são fungos oportunistas que estão entre os agentes etiológicos mais comuns, causando infecções com diagnóstico e tratamento difíceis e com altos índices de mortalidade (Perlroth et al., 2007).

Candida spp. é um microrganismo comensal e pode estar presente no ser humano colonizando pele e mucosas do trato gastrointestinal, oral e vaginal. Contudo, na presença de fatores de risco pode causar sérias infecções, desde candidíases orais até infecções sistêmicas (Ellepola & Samaranayake, 2000). Esses fatores incluem o uso de antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, imunossupressão, procedimentos cirúrgicos, tratamentos hospitalares intensivos e prolongados. As infecções por leveduras também são associadas à formação de biofilmes em dispositivos utilizados em tratamentos médicos tais como implantes, cateteres vasculares, lentes de contato, além de próteses dentárias entre outros (Douglas, 2002). Biofilmes são definidos como uma comunidade estruturada de microrganismos aderida a uma superfície artificial ou biológica protegida por uma matriz exopolimérica de substâncias extracelulares (Pierce et al., 2008). Uma das características mais importantes de biofilmes é um alto nível de resistência aos antimicrobianos, e no caso de biofilmes de *Candida albicans*, a resistência a drogas azólicas e anfotericina B foi demonstrada em diversos estudos (Baillie & Douglas, 2000; Robbins et al., 2011; Ruhnke et al., 2005).

Candida albicans pode ser isolada da cavidade oral de 25 a 50% dos indivíduos saudáveis e normalmente essa levedura pode coexistir com outros microrganismos da microbiota oral de forma saprofítica (Bahna et al. 2007). Alterações locais ou sistêmicas podem proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento de infecção conhecida como candidíase oral (Ellepola &

Samaranayake, 2000). Fatores sistêmicos incluem idades extremas, desordens endócrinas, antibioticoterapia e imunossupressão (Nalbant et al., 2008). Os fatores locais incluem a hipossalivação induzida por fármacos ou radiação, danos no tecido local (mucosite secundária à radioterapia ou quimioterapia) e uso de próteses dentárias removíveis com adaptação ou higienização inadequadas (Fischer & Epstein, 2008). Outras espécies do gênero além de *C. albicans* também têm sido isoladas da cavidade oral como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis*, principalmente em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Kantarcioglu & Yucel, 2002).

Dentre as diversas formas clínicas da candidíase oral destaca-se a estomatite induzida por prótese, uma reação inflamatória da mucosa alveolar e palatal causada pelo uso contínuo de próteses dentárias removíveis que se apresentam com higienização inadequada ou adaptação incorreta. A prevalência dessa infecção varia entre 15 a 65% em usuários de prótese total removível (Abbeele et al., 2008), e a espécie *C. albicans* atua como o patógeno mais importante. A superfície rugosa da prótese contribui para a adesão e formação de biofilmes de *C. albicans* (Chandra et al., 2001).

Diferentes métodos de tratamento para a estomatite induzida por prótese têm sido propostos, e incluem higienização eficiente e remoção das próteses à noite, além de limpeza por imersão das próteses em agentes químicos como hipoclorito de sódio ou clorexidina. O tratamento pode ser associado a antifúngicos imidazólicos tópicos como miconazol e clotrimazol ou agentes poliênicos como nistatina e anfotericina B (LaFleur et al., 2011). Agentes triazólicos sistêmicos como o fluconazol e itraconazol também são utilizados, principalmente em pacientes com doenças sistêmicas que causam imunossupressão (Cross et al., 2004). Contudo, o desenvolvimento da resistência aos antifúngicos está relacionada à administração de altas doses, uso prolongado (Ruhnke et al., 2005) e associação de biofilme (Perumal et al., 2007).

Os enxaguatórios bucais antissépticos (Anvisa) possuem substâncias químicas antissépticas em sua composição e constituem recursos químicos que auxiliam na remoção de biofilmes orais, controlando o crescimento microbiano. Entre os compostos ativos mais utilizados podemos citar a clorexidina, o cloreto de cetilpiridíneo, óleos essenciais entre outros. Os antissépticos bucais têm papel importante na prevenção e como coadjuvantes no tratamento da candidíase oral.

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica é de origem popular, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentivou o estudo científico dessas plantas a partir dos anos setenta, com o objetivo de conhecer seus benefícios e riscos (Almeida & Menezes, 2002). As plantas produzem moléculas orgânicas que estão envolvidas na proteção contra bactérias, vírus, fungos, insetos e animais. Muitos desses compostos químicos são biologicamente ativos quando isolados, e podem ser considerados medicamentos em potencial (Page et al., 2004). Já existem no mercado associações de plantas medicinais a dentifrícios e enxaguatórios bucais e, atualmente, diversos extratos de plantas são testados com o objetivo de reduzir a atividade de microrganismos da cavidade bucal (Molina et al., 2008; Lubian et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre atividade antifúngica de fármacos ou substâncias de origem natural é realizado com células planctônicas (não aderidas). Crescentes dados sobre resistência associadas a biofilmes tornam relevantes a determinação da atividade de agentes químicos que possam impedir ou diminuir a adesão celular e a formação de biofilme, para que sejam efetivamente usados na prevenção e no tratamento da candidíase oral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de extratos de plantas e de antissépticos bucais sobre isolados de *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir extratos de plantas medicinais com potencial ação antifúngica, com base em pesquisa na literatura;
- Estabelecer Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos de plantas e antissépticos bucais através de microdiluição em placa;
- Avaliar a ação inibitória (antiadesiva) de antissépticos bucais na formação de biofilme em superfície artificial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, composto por cerca de 150 espécies descritas do gênero. A maioria das espécies de *Candida* é incapaz de crescer a 37°C e por isso poucas são associadas à colonização em humanos. Algumas espécies comensais em humanos podem agir como patógenos oportunistas em indivíduos debilitados (Schauer & Hanschke, 1999). A espécie mais patogênica e mais relacionada a processos infecciosos no ser humano é *Candida albicans*.

As espécies de *Candida*, assim como outros fungos, são organismos eucarióticos e possuem parede celular bem definida, composta por manoproteínas, β -1,3-D-glucanas, β -1,6-D-glucanas, quitina e uma pequena quantidade de proteínas e lipídios. A membrana plasmática tem dupla camada lipídica, contendo vários esteróis, onde o principal é o ergosterol (Akpan & Morgan, 2002).

Candida albicans é uma espécie diplóide, cuja principal característica genômica é o polimorfismo, fator adaptativo fundamental neste tipo de levedura. *Candida albicans* pode se apresentar na forma de levedura (blastoconídeo) no estado saprofítico associada à colonização assintomática; ou na forma filamentosa (pseudo-hifas e hifas) observada em processos patológicos (Sudbery et al., 2004). Na forma de levedura (Figura 1), as células se apresentam nas formas esféricas ou ovais, enquanto as hifas são compostas de filamentos longos e ramificados (Sudbery et al., 2004).



Figura 1- *Candida albicans* na forma de levedura (Fonte: www.doctorfungus.org)

Hifas verdadeiras são distintas das pseudo-hifas (que são as leveduras alongadas e unidas por constrictões) por possuírem septos transversos dentro dos filamentos (Williams & Lewis, 2011). A Figura 2 mostra hifas e pseudo-hifas de *Candida albicans* coradas por Calcofluor branco (CFW), um corante inespecífico que tem a capacidade de se ligar à quitina e exibe fluorescência quando exposto a luz ultravioleta (Kumar et al., 2009).

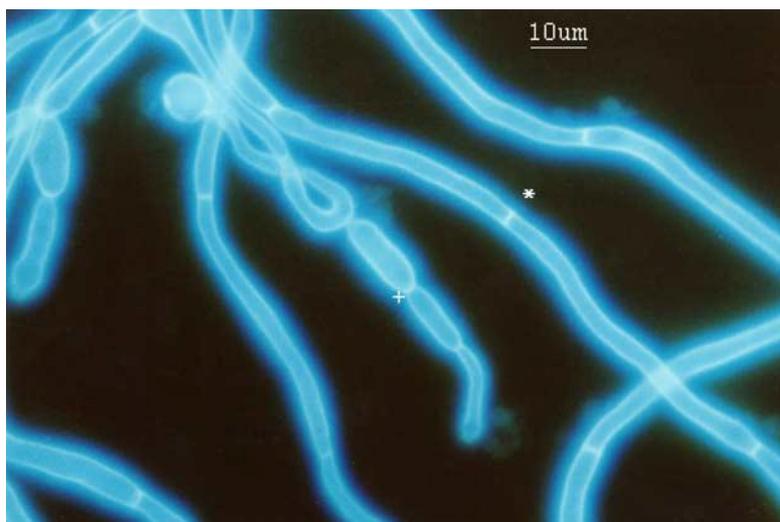


Figura 2 - Hifas verdadeiras (*) e pseudo-hifas (+) de *Candida albicans* (Fonte: Williams & Lewis, 2011).

A patogenicidade da *Candida albicans* está relacionada a alguns fatores de virulência, como a aderência, a produção do tubo germinativo, a

hidrofobicidade da superfície celular, a variação fenotípica (*switching*) e a produção de enzimas extracelulares (Sudbery et al., 2004).

Candida albicans encontra-se na forma leveduriforme quando coloniza superfícies epiteliais. A adesão inespecífica de *C. albicans* às células epiteliais é iniciada através de interações fracas e reversíveis envolvendo forças hidrofóbicas e eletrostáticas (Cotter & Kananagh, 2000). A adesão específica entre *C. albicans* e receptores em tecidos do hospedeiro resulta em uma forte ligação covalente. Genes da ALS (agglutinin-like sequence) (Hoyer, 2001) e também Hwp1 (hyfas wall proteins) (Staab et al., 1999) codificam glicoproteínas de parede celular que promovem adesão de *C. albicans* às superfícies epiteliais e a interação com bactérias orais; também podem estimular a formação de biofilme em próteses dentais (Silverman et al., 2010).

A formação do tubo germinativo marca o começo do crescimento das suas hifas, promove sua aderência a células epiteliais e é uma forma de resistência à fagocitose. A produção de hifas também está relacionada com maior expressão de vários genes de virulência (Kumamoto & Vines, 2005).

A produção de enzimas extracelulares é um fator importante na patogenicidade de *Candida albicans*. As enzimas atuam quebrando barreiras do hospedeiro e facilitando a penetração nos tecidos subjacentes. Dentre estas enzimas, as aspartil-proteases secretadas (SAP) são consideradas as mais importantes (Naglik et al., 2004). Elas clivam várias proteínas fundamentais para a defesa do hospedeiro, como as imunoglobulinas A e G, além de degradar queratina e colágeno, facilitando a invasão e infecção tecidual e promovendo uma fonte de nitrogênio durante a colonização. Diferentemente das outras proteases, estas enzimas mostram ótima atividade em condições ácidas (pH < 4.0), demonstrando um papel importante nas infecções orais em pacientes portadores de próteses dentais removíveis que proporcionam em sua superfície interna um ambiente ácido (Williams et al., 2011).

Outro grupo de enzimas hidrolíticas produzidas por espécies de *Candida* são as fosfolipases (PLs), com sete genes de codificação distintos já identificados em *C. albicans*. Através da hidrólise de ligações éster de fosfolipídios, as PLs

podem degradar a membrana das células hospedeiras levando à lise celular e morte. Por este processo, tanto a aderência de *Candida* aos sítios receptores e da sua subsequente penetração do tecido danificado pode ser facilitada (Williams & Lewis, 2011).

A elevada frequência de mudança fenotípica reversível de cepas de *Candida albicans* permite uma melhor adaptação do patógeno ao meio, agindo como mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro e promovendo a formação de biofilme (Morschhäuser, 2010; Soll, 2009). Esta característica também é responsável pela aparente dissonância entre os resultados encontrados às vezes “*in vitro*” daqueles encontrados “*in vivo*” em relação aos fatores de virulência da cepa (Soll, 2009).

3.2 Candidíase oral

Candidíase oral é uma infecção causada por *Candida albicans* que pode ter manifestações clínicas variadas, como as formas de candidíase pseudomembranosa, candidíase eritematosa, candidíase hiperplásica e candidíase mucocutânea (Neville et al., 2004).

Candidíase pseudomembranosa, conhecida como “sapinho”, é frequentemente relatada em neonatos e em idosos a taxas de 5-10% (Samaranayake et al., 2009). A infecção é caracterizada pela presença de placas brancas superficiais (Figura 3a), que são facilmente removidas por raspagem suave da lesão, revelando uma mucosa eritematosa subjacente (McCullough & Savage, 2005). As placas brancas são compostas por uma massa de hifas, leveduras, células epiteliais descamadas e fragmentos de tecido necrótico (Neville et al., 2004). A infecção geralmente ocorre quando há uma limitação nutricional, supressão imunitária ou uma doença de base, mais notadamente infecção pelo HIV e AIDS (Thompson et al., 2010).

Na candidíase eritematosa, a mucosa apresenta-se com vermelhidão e edema, e podem existir várias apresentações clínicas. Candidíase atrófica aguda é

desenvolvida após uma redução nos níveis da microbiota bacteriana associada ao tratamento com antibióticos de amplo espectro, o que diminui a competição microbiana de *C. albicans* em termos de nutrição e locais de adesão (Williams et al., 2011). Clinicamente apresenta-se como uma lesão avermelhada e dolorosa, frequentemente no dorso da língua.

Outras formas de candidíase eritematosa são geralmente crônicas e assintomáticas. Atrofia papilar da língua ou glossite romboidal mediana apresenta-se como uma área eritematosa bem delimitada na linha média da superfície dorsal da língua (Figura 3b). O eritema deve-se também à perda das papilas filiformes nesta área (Neville et al., 2004). A queilite angular é descrita como uma lesão associada a *Candida albicans* e se manifesta nos ângulos da boca (Hatakka et al., 2007), caracterizada por eritema, fissuração e descamação. Pode ocorrer isoladamente em pessoas idosas com dimensão vertical reduzida. Estudos microbiológicos indicam a associação de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* em cerca de 60% dos casos de infecção (Neville et al., 2004). É importante ressaltar que queilite angular frequentemente ocorre em pacientes com as formas existentes de candidíase na mucosa oral.

A estomatite associada à prótese pode desenvolver-se sob qualquer prótese acrílica ou aparelho intra-oral, mas é quase exclusivamente encontrada nos tecidos palatinos (Figura 3c). Os principais fatores do hospedeiro associados a esta condição são higiene inadequada dos tecidos bucais e da prótese, a retenção da prótese na cavidade oral durante a noite, ou próteses mal adaptadas que traumatizam a mucosa (Figueiral et al., 2007). A estomatite associada à prótese está presente em cerca de 75% dos usuários de prótese total (Penha et al., 2000), e mesmo apresentando sinais clínicos muitas vezes a presença desta infecção pode não ser percebida pelo usuário por ser assintomática (Barbeau et al., 2003).

A levedura mais prevalente nas lesões de estomatite associada à prótese é a *C. albicans*. Outras espécies isoladas de próteses incluem *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Estas espécies, no entanto, estão

presentes com menor prevalência que *C. albicans* (Campos et al., 2008). Além de isolar a mucosa da ação de limpeza da musculatura oral, as condições anaeróbicas e ácidas sob a superfície da prótese promovem um ambiente de contato com a mucosa favorável para a proliferação fúngica. A maior presença de hifas de *C. albicans* tem sido relatada em pacientes com estomatite. As formas filamentosas podem aderir melhor e penetrar nas microfissuras da superfície de próteses e são mais invasivas para a mucosa oral (Ramage et al., 2004).

A candidíase hiperplásica crônica (leucoplasia por *Candida*) é caracterizada por placas brancas que não podem ser removidas por raspagem e localizadas com maior frequência na região anterior da mucosa jugal ou no dorso da língua (Neville et al., 2004) (Figura 3d). Estudos indicam que essas lesões possuem maior probabilidade de transformação maligna (Barrett et al., 1998). As lesões brancas da candidíase hiperplásica não são removidas com fricção, e a inflamação só pode ser diagnosticada através de exame histopatológico que revela hifas de *Candida* invadindo o epitélio e um infiltrado inflamatório crônico (Williams et al., 1997).

Em uma discussão sobre as formas orais de candidíase, é necessário mencionar a candidíase mucocutânea crônica (CMC), caracterizada pela ocorrência generalizada de candidíase superficial da pele, unhas, e as membranas mucosas (incluindo as da cavidade oral) de indivíduos infectados (Eyerich et al., 2010; Liu & Hua, 2007). CMC é primariamente associada com desordens resultantes no incorreto funcionamento de linfócitos T (Eyerich et al., 2010).

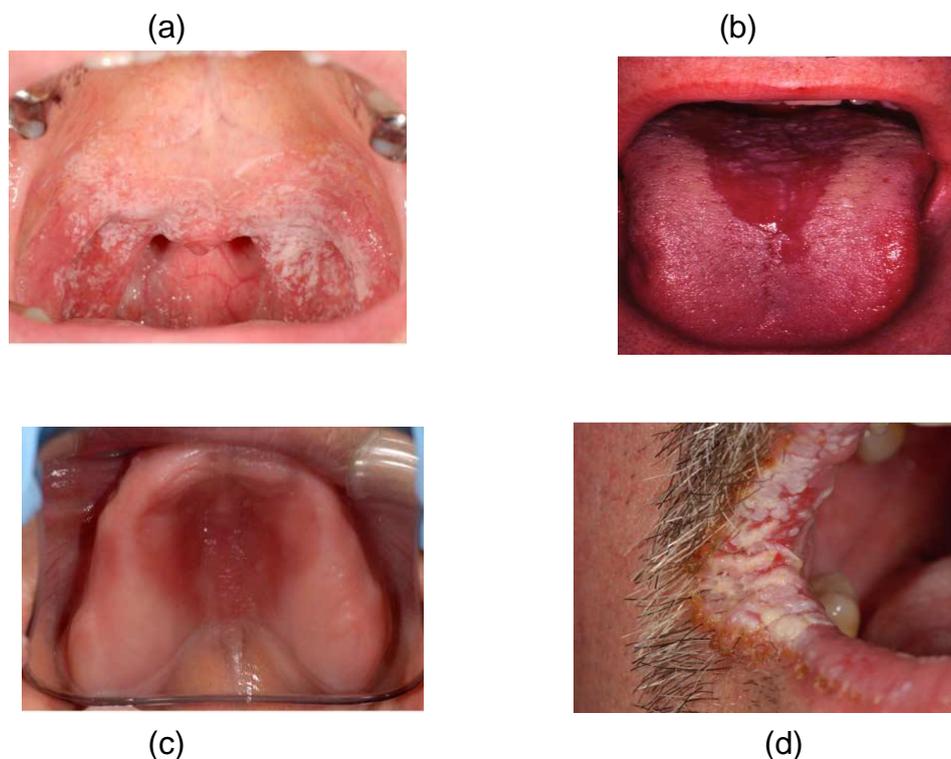


Figura 3 – Formas clínicas da candidíase oral: (a) candidíase pseudomembranosa; (b) candidíase eritematosa (atrofia papilar central); (c) candidíase eritematosa (estomatite associada à prótese); (d) candidíase hiperpásica. (Fonte: Williams & Lewis, 2011).

3.3 Biofilmes

Biofilmes são comunidades de microrganismos ligados a uma superfície e embebidos em uma matriz extracelular produzida pelos próprios microrganismos, que consiste de polissacarídeos da parede celular e proteínas (Costerton et al., 2003; Baillie & Douglas, 2000). Biofilmes são associados a mais de 65% das infecções hospitalares (Douglas, 2003). Diferenças fenotípicas ocorrem entre células sésseis (aderidas) e planctônicas e indicam que as cepas de *Candida* com alta capacidade de formar biofilmes são geralmente mais virulentas do que outras (Ramage et al., 2005).

Biofilmes de *Candida albicans* são amplamente conhecidos e ocorrem em superfícies artificiais ou biológicas (Ramage et al., 2005). O biofilme formado

em uma prótese dental é um importante fator predisponente à candidíase oral. *C. albicans* adere rapidamente à superfície da prótese e utiliza microfissuras dentro do material para facilitar a retenção (Figura 4) (Ramage et al., 2004).

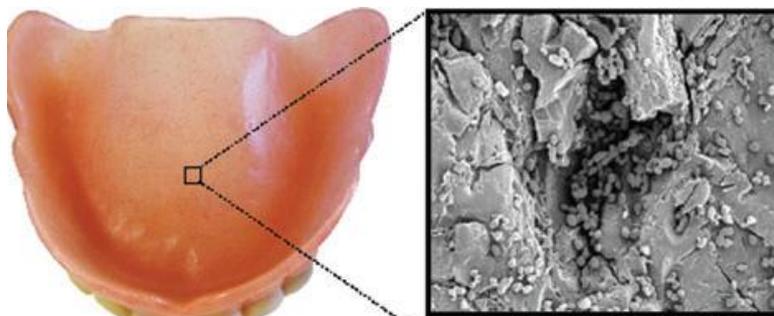


Figura 4 - Representação microscópica (1000X) de células de *Candida albicans* aderidas sobre a superfície de uma prótese. (Fonte: Gendreau & Loewy, 2011).

Na cavidade oral, células aderidas podem ser protegidas contra a ação mecânica da saliva, e o biofilme em si é uma barreira de defesa contra penetração de fatores de defesa do hospedeiro e de antimicrobianos. Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos podem estar relacionados com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células que incluem o aumento da densidade celular, o aumento de bombas de efluxo de drogas e a diminuição do conteúdo do ergosterol (Robbins et al., 2011).

O passo inicial na formação de biofilme consiste na adesão de células fúngicas, da forma de levedura a uma superfície, como pele, mucosas, implantes médicos, cateteres e próteses. A adesão inespecífica de *Candida albicans* a uma determinada superfície é iniciada através de interações fracas e reversíveis envolvendo forças hidrofóbicas e eletrostáticas (Cotter & Kavanagh, 2000). A natureza dessas forças é, em parte, regida pelo ambiente local, no entanto, a variação genotípica pode alterar a hidrofobicidade da célula e dar a

certos isolados um maior potencial de patogenicidade (Hazen, 1989). A adesão específica entre *Candida albicans* e receptores em tecidos do hospedeiro resulta em uma forte ligação covalente.

Em seguida ocorre uma fase de filamentação e proliferação, na qual são formadas múltiplas camadas de células sésseis de diferentes morfologias, incluindo pseudo-hifas e hifas. A maturação do biofilme resulta em uma rede complexa de células incorporadas em material extracelular polimérico, composto de carboidratos, proteínas, hexosamina e ácido urônico, bem como constituintes do hospedeiro em ambientes naturais (Al-Fattani & Douglas, 2006). Há evidências que glicoproteínas, ácidos nucleicos e células, tais como neutrófilos, podem participar na maturidade da matriz, em particular em sítios da mucosa (Martins et al., 2010). Biofilmes maduros de *Candida albicans* mostram uma arquitetura tridimensional complexa, com uma densa rede de leveduras, hifas e pseudo-hifas (Kumamoto, 2002; Lopez-Ribot, 2005).

Uma vez atingida a maturação, ocorrem no biofilme uma série de alterações na forma de crescimento e cooperação fisiológica entre as células (Costerton et al., 2003). Existem evidências da presença de moléculas de sinalização celular em biofilmes frequentemente denominados moléculas de quórum sensing, que regulam a expressão de uma variedade de genes que podem coordenar não só a taxa de crescimento, mas o desprendimento de biofilme, a virulência, a resistência antimicrobiana e até mesmo indução de citocinas do hospedeiro. No caso de biofilmes de *Candida*, duas moléculas de detecção de quórum já foram descritas, farnesol (3,7,11-trimetil-2, 6,10 - dodecatriene-1-ol) e tirosol (2 - [4-hidroxifenil] etanol). Farnesol demonstra ser um inibidor do desenvolvimento de hifas em *C. albicans* (Shchepin et al., 2003), e a sua acumulação no biofilme maduro promove a liberação ou descolamento de leveduras a partir do biofilme (Nickerson et al., 2006). Em contraste, tirosol parece acelerar a filamentação das leveduras sob condições adequadas (Chen et al., 2004), e desempenha um papel importante na proliferação após a fase de aderência (Alem et al., 2006).

O crescimento do biofilme está limitado pela existência de nutrientes no meio ambiente. O último passo, a dispersão das células a partir de um biofilme, desempenha um papel fundamental no ciclo de desenvolvimento de biofilme e está associado à candidemia e doenças invasivas (Uppuluri et al., 2010).

3.4 Tratamento da Candidíase Oral

O método mais importante para prevenção da candidíase oral é minimizar ou eliminar fatores predisponentes, que incluem o controle dos microrganismos não somente nas mucosas, mas também em superfícies artificiais, como próteses removíveis, para evitar uma infecção (Ellepola & Samaranayake, 2000). Na presença da infecção, entretanto, devem ser implementadas medidas tanto de controle mecânico quanto químico da microbiota, de forma a restabelecer seu equilíbrio o mais prontamente possível; dessa forma, a utilização de antimicrobianos se faz necessária. Frequentemente a atenção à causa primária de infecções fúngicas irá eliminar a necessidade de tratamentos prolongados (Scully et al., 1994).

3.4.1 Antifúngicos

O tratamento da candidíase oral segue protocolo definido pela equipe de trabalho e depende da gravidade do caso e da presença de fatores causais associados. Os antifúngicos tópicos utilizados são os derivados imidazólicos miconazol (na forma de gel) e clotrimazol (pastilhas) (Andes, 2003; LaFleur et al., 2011) ou polienos como nistatina e anfotericina B na forma de suspensão oral e pastilhas (LaFleur et al., 2011). Polienos atuam através de ligação direta com o ergosterol encontrado nas membranas de células fúngicas, o que provoca a formação de poros na membrana, perda de conteúdo citoplasmático e morte celular (Katzung, 2006).

Nas situações em que os fatores predisponentes não podem ser eliminados, como nos pacientes portadores de HIV ou pacientes transplantados, ou nos casos em que a infecção possui um poder invasivo bem preponderante, faz-se

necessário o uso dos derivados azólicos (itraconazol, fluconazol), visto que estes possuem um efeito terapêutico sistêmico mais eficaz frente aos agentes tópicos (Vazquez, 2000). O mecanismo de ação é a inibição da enzima lanosterol α -1 desmetilase envolvida na síntese do ergosterol, o que compromete a permeabilidade da membrana e impede o crescimento celular (Andes, 2003). O fluconazol apresenta um bom perfil de segurança quando administrado sistemicamente, com poucas contra-indicações ou efeitos secundários. Entretanto resistência ao fluconazol tem sido demonstrada por vários estudos (Ramage et al., 2005; Robbins et al., 2011).

3.4.2 Enxaguatórios bucais antissépticos

Dentre os agentes utilizados na prevenção e no tratamento de infecções da cavidade oral, destacam-se os enxaguatórios bucais antissépticos (Anvisa), que são indicados para auxiliar na remoção química de biofilmes orais e controle do crescimento microbiano. Os antissépticos bucais agem rompendo a parede celular e impedindo a atividade enzimática da célula microbiana, além de prevenir a agregação microbiana e diminuir sua multiplicação (Bugno et al., 2006). Esses agentes têm um papel importante na prevenção e como coadjuvantes no tratamento da candidíase oral, que em geral baseia-se no uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos.

Há uma grande disponibilidade de enxaguatórios bucais antissépticos contendo diferentes ingredientes ativos, como óleos essenciais, clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo, entre outros. A maioria deles contém entre 5 a 25% de álcool, que é utilizado para estabilizar e dissolver os ingredientes ativos, proporcionar uma sensação refrescante, aumentar o prazo de validade e prevenir a contaminação por microrganismos. No entanto, o uso desses produtos é desaconselhável em crianças, gestantes, lactantes, alcoolistas, pacientes com xerostomia e pacientes com mucosite ou que estão sob radioterapia de cabeça e pescoço (White, 2005).

A indicação correta dos antissépticos bucais é necessária para garantir a sua eficácia e segurança. O uso prolongado dos antissépticos bucais que possuem álcool em sua formulação pode causar uma descamação da mucosa, além de afetar as papilas linguais, interferindo na função gustativa (White, 2005). Atualmente existem apresentações comerciais sem álcool de diversos antissépticos bucais. O aparecimento de manchas em dentes e restaurações pode ser solucionado com a descontinuidade do uso ou através de limpeza profissional.

A clorexidina é um agente antimicrobiano altamente eficaz e pode ser utilizada como padrão-ouro para medir a potência de outros agentes. Ela é classificada quimicamente como uma bisguanidina catiônica que se liga a superfícies carregadas negativamente, e essa ligação resulta em perda de integridade estrutural da membrana, capacidade diminuída para aderir, fragmentação da parede celular e morte do microrganismo (Reche, 2005). Uma propriedade importante da clorexidina é a sua capacidade intrínseca de ser retida pelas superfícies orais e ser liberada gradualmente durante muitas horas, o que é definido como substantividade. Ellepola & Samaranayake (2000) demonstraram que bochechos com clorexidina a 0,2% exibem benefícios clínicos no tratamento de candidíase eritematosa e pseudomembranosa.

O cloreto de cetilpiridíneo pertence à classe dos compostos de amônia quaternária e é um agente antimicrobiano amplamente utilizado (Paraskevas, 2005). O mecanismo de ação está relacionado com o aumento da permeabilidade da parede celular que favorece a lise, diminui o metabolismo celular e a habilidade do microrganismo em aderir à superfície dentária. O cloreto de cetilpiridíneo liga-se facilmente aos tecidos orais, entretanto sua substantividade é inferior à da clorexidina (Alves et al., 2012). Apesar da sua maior retenção inicial o cloreto de cetilpiridíneo é eliminado da cavidade oral mais rapidamente.

O antisséptico bucal que apresenta o maior histórico de uso é composto por solução hidroalcoólica dos óleos essenciais timol, mentol e eucaliptol. Os óleos essenciais são utilizados como flavorizantes, entretanto podem contribuir com a

propriedade antimicrobiana do produto devido à presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes, os quais agem principalmente sobre bactérias gram-positivas e leveduras (Bugno et al., 2006). Como efeito adverso, podemos citar a sensação de queimação devido à alta concentração de álcool em sua composição. Atualmente já existe no mercado a apresentação da formulação sem álcool.

O peróxido de hidrogênio é utilizado como um antisséptico para o controle de várias condições bucais. Trata-se de um agente oxidativo instável, e sua ação antimicrobiana se dá pela formação de radicais hidroxila livres, que atacam a membrana citoplasmática, DNA e outros componentes celulares essenciais (Modesto et al., 2000). Sua aplicação em Odontologia se dá principalmente como complemento ao tratamento da doença periodontal associado à clorexidina, pois além de reduzir o manchamento causado pela clorexidina, essa combinação é mais eficiente com relação ao potencial antimicrobiano quando comparado aos efeitos destes antissépticos separados (Lee, 2001).

3.4.3 Estratégias para controle de biofilmes orais

Não há uma única abordagem que possa ser utilizada para combater especificamente biofilmes de *Candida*, mas uma variedade de métodos mecânicos e químicos para melhorar a higiene oral são geralmente adotados. Um agente antimicrobiano ideal deve prevenir o desenvolvimento do biofilme, e ser eficaz contra biofilmes estabelecidos. A escovação oferece benefícios na remoção do biofilme, mas pode ser limitada a sítios acessíveis dentro da cavidade oral e pode ter efeitos deletérios sobre superfícies de próteses acrílicas se dentífricos abrasivos forem utilizados (Ramage et al., 2004). Em tais casos, a superfície rugosa da prótese pode ser mais propícia à subsequente formação de biofilme.

Nos casos de estomatite associada à prótese, é essencial a sua remoção durante a noite, mantendo-a imersa em água filtrada. No período em que a prótese não está em contato com a mucosa oral, agentes antimicrobianos

podem ser empregados, utilizando preparações de limpeza de próteses como hipoclorito de sódio a 0,5%, bicarbonato de sódio ou clorexidina a 0,2% por 30 minutos. Água a temperaturas elevadas também pode ser uma alternativa para a limpeza, além da desinfecção no micro-ondas por 03 minutos a 650 W (Nirale et al., 2012).

3.5 Métodos de estudo de biofilmes

Existem vários métodos descritos para o estudo *in vitro* de quantificação de biofilmes formados por microrganismos. As placas de poliestireno para microtitulação com 96 poços permitem uso fácil e generalizado, análises comparativas entre as linhagens e espécies para testes de sensibilidade a antifúngicos (Pierce et al., 2008) e estudos de formação de biofilme de diferente espécies de *Candida*.

Os métodos de estudo podem ser classificados em ensaios de biomassa, com base na quantificação da matriz e ambas as células vivas e mortas; ensaios de viabilidade celular, com base na quantificação de células viáveis; e ensaios de quantificação da matriz, com base na coloração específica de componentes da matriz (Peeters et al., 2008). Condições ótimas para obter resultados reproduzíveis devem ser definidas para cada ensaio.

Biofilmes podem ser detectados por coloração e microscopia ou por quantificação espectrofotométrica através da leitura da densidade óptica (DO). Os corantes utilizados para a quantificação da biomassa de todo o biofilme como o cristal violeta (Stepanovic' et al., 2007) e safranina são corantes básicos que se ligam a moléculas de superfície e polissacarídeos na matriz extracelular carregadas negativamente. Quando safranina é utilizada a leitura da DO é realizada a 492 nm, e um valor de mais de 0,05 é necessário para indicar a formação de biofilmes (Standar et al., 2010). Esse método tem uma abordagem de leitura fácil e requer pouco tempo e um custo menor.

Para distinguir entre células vivas e mortas, técnicas baseadas na atividade metabólica das células viáveis estão disponíveis. O ensaio com o sal de tetrazólio (XTT) baseia-se na redução do corante para um formazano solúvel em água (Gabrielson et al., 2002). A absorvância do sobrenadante de células é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Outro ensaio de viabilidade baseia-se na redução da resazurina por células metabolicamente ativas. Este é um composto azul que pode ser reduzido a resorufina rosa fluorescente (O'Brien et al., 2000).

A quantificação da matriz de biofilme, um componente essencial do biofilme, pode ser realizada com o corante 1,9 - dimetil azul de metileno (DMMB) que forma um produto insolúvel com polissacarídeos sulfatados na matriz do biofilme. A quantidade de corante liberado por adição de uma solução que desfaz essas ligações é medida por espectrofotometria e reflete a quantidade de polissacarídeos sulfatados presentes na matriz de biofilme (Peeters et al., 2008).

A quantificação do biofilme pode também ser feita por determinação da quantidade de ATP libertada pelas células após ruptura celular (Nikawa, 2003) ou pela determinação da atividade respiratória do biofilme. Os resultados obtidos por esses métodos revelam excelentes correlações com os resultados obtidos pela quantificação do peso seco dos biofilmes.

3.6 Plantas medicinais

As plantas medicinais são representadas por todas as espécies silvestres ou cultivadas, quando utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico ou quando estas são fontes de fármacos ou de seus precursores. Assim, plantas medicinais são valiosos produtos vegetais, frequentemente usados no tratamento de várias doenças e constituem uma importante fonte de novos componentes biologicamente ativos (Page et al., 2004).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é uma prática antiga, amplamente utilizada pela população mundial. O conhecimento popular tem grande contribuição na divulgação dos benefícios obtidos a partir do uso destas plantas e desperta o interesse de pesquisadores em estudos multidisciplinares para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (Maciel et al., 2002).

Várias substâncias utilizadas na medicina popular como agentes antimicrobianos foram introduzidas nos produtos de higiene oral amparados por estudos laboratoriais e clínicos. Carreto (2007) verificou que o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* apresentou atividade fungistática e fungicida para cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Além disso, o óleo essencial de *Mentha piperita* exibiu atividade inibitória sobre 48,75% das 80 cepas de *Candida* testadas. Hammer et al. (2000) demonstraram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi capaz de inibir a formação de tubos germinativos por *C. albicans*.

Própolis é uma resina elaborada pelas abelhas a partir da coleta de substâncias secretadas pelas plantas, sendo amplamente utilizada no preparo de cremes, loções e pomadas. D'Aurea et al. (2003) avaliaram o efeito do extrato de própolis sobre os fatores de virulência da *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que houve redução significativa na formação de hifas e atividade de fosfolipase. Molina et al. (2008) verificaram que os extratos glicólicos de própolis apresentaram atividade fungicida para todas as cepas de *C. albicans* testadas, e os extratos glicólicos de *Salvia officinalis* inibiram 80% desses isolados. Weckesser et al. (2007) avaliaram extratos de diferentes plantas, incluindo *Salvia officinalis*, sobre 29 bactérias aeróbias, anaeróbias e leveduras e verificaram importante ação antimicrobiana.

No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) foi aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, a qual se constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente,

desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (Brasil, 2006). As ações decorrentes desta política, manifestadas em um Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, são imprescindíveis para garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Brasil, 2009).

Em Vitória-ES, foi realizada pesquisa para averiguar o uso tradicional de plantas medicinais que apontou a utilização por 80% da população de plantas medicinais para tratamento de doenças mais simples. A partir da articulação intersetorial e das discussões com a comunidade, implantou-se em 1990 o Viveiro Municipal onde passaram a ser produzidas mudas de plantas medicinais para posterior utilização em trabalhos educativos e de campo em todo o município (Vitória, 2008). Com base em levantamento etnobotânico sobre plantas utilizadas pela população brasileira no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas realizado por Fenner et al.(2006), algumas espécies disponíveis no Viveiro Municipal foram selecionadas (Figura 5- A/B/C/D/E) para serem avaliadas quanto ao seu potencial efeito antifúngico.

Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) pertence à família Malvaceae e é amplamente utilizado na medicina tradicional como cicatrizante. O chá das raízes é utilizado para falta de memória, e o chá das flores e frutos verdes é aplicado em “frieiras” e micoses. Os constituintes mais importantes são o gossipol e seus derivados, presentes na semente e em menor quantidade na raiz e na casca (Lorenzi & Matos, 2002). Menegassi et al. (2008) isolaram uma urease nas sementes de algodão que apresentou atividade antifúngica por causar lesões da parede ou membrana celular visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Foram evidenciadas modificações no crescimento das hifas, como desorganização e ramificações, além de ruptura da parede celular, sugerindo assim a ocorrência de plasmólise e morte das células fúngicas.

Arctium lappa, conhecida popularmente como bardana, é uma planta perene, originária do Japão, pertencente à família Asteraceae, e caracteriza-se por apresentar folhas grandes e flores arroxeadas. Diversas atividades biológicas desta planta já foram descritas na literatura (Knott et al., 2008; Ferracane et al., 2010), entre elas a atividade antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias e leveduras especialmente do gênero *Candida* (Lubian et al., 2010). A importância dessa planta levou sua inclusão na Farmacopéia Brasileira primeira edição (Brandão, 2006).

A cavalinha (*Equisetum* sp) pertence à família Equisetaceae e é conhecida também como equiseto (Martins, 2000). É uma planta perene que não possui flores nem sementes. O nome cavalinha é dado indistintamente a todas as espécies do gênero *Equisetum* ao qual ela pertence. As indicações e propriedades terapêuticas, segundo a literatura popular, são para tratar edemas por retenção de líquidos (diurético), resfriados, gripes, herpes e aftas (Lorenzi & Matos, 2002). Na composição química desse gênero, são registradas a presença dos alcalóides nicotina e palustrina (equisetina), dos flavonóides apigenina, quercetina e campferol, e de derivados dos ácidos clorogênico, caféico e tartárico (Lorenzi & Matos, 2002).

Cecropia pachystachya Trécul. (embaúba), também conhecida por nomes como umbaúba, imbaúba, umbaubeira, árvore-da-preguiça, entre outros, é característica de solos de maior umidade e tem preferência pelos locais ensolarados. Essa planta se distribui desde o México até a Argentina (Hikawczuk, 1998) e no Brasil situa-se principalmente no litoral do Nordeste, passando por Sudeste, Centro-Oeste até Santa Catarina. É utilizada como anti-hipertensiva e no tratamento de úlceras e leucorréias (Fenner et al., 2006). Estudos químicos de espécies do gênero *Cecropia* revelam a presença de flavonóides como metabólitos predominantes. Simoni et al. (2007) demonstraram que *Cecropia pachystachya* Trécul. apresentou atividade antiviral contra herpesvírus animal em estudos de biomonitoramento.

Pogostemon heyneanus (patchouli), pertencente à família Lamiaceae, é uma planta herbácea nativa do sudeste Asiático e cultivada extensivamente na

Índia, Malásia, Indonésia e Cingapura. No Brasil, é cultivada principalmente no norte e nordeste, onde é chamada de oriza. Plantas do gênero *Pogostemon* produzem o óleo essencial utilizado na fabricação de produtos cosméticos como aromatizantes em perfumes e têm grande importância na medicina chinesa tradicional (Maia et al., 2001). Como propriedades terapêuticas destacam-se as ações antidepressiva, anti-inflamatória, antisséptica e afrodisíaca. Além destas propriedades, pesquisas recentes demonstraram atividade antifúngica, anti-helmíntica e antitripanossoma do óleo essencial de patchouli (Sugimura et al., 2005; Zhao et al., 2005).

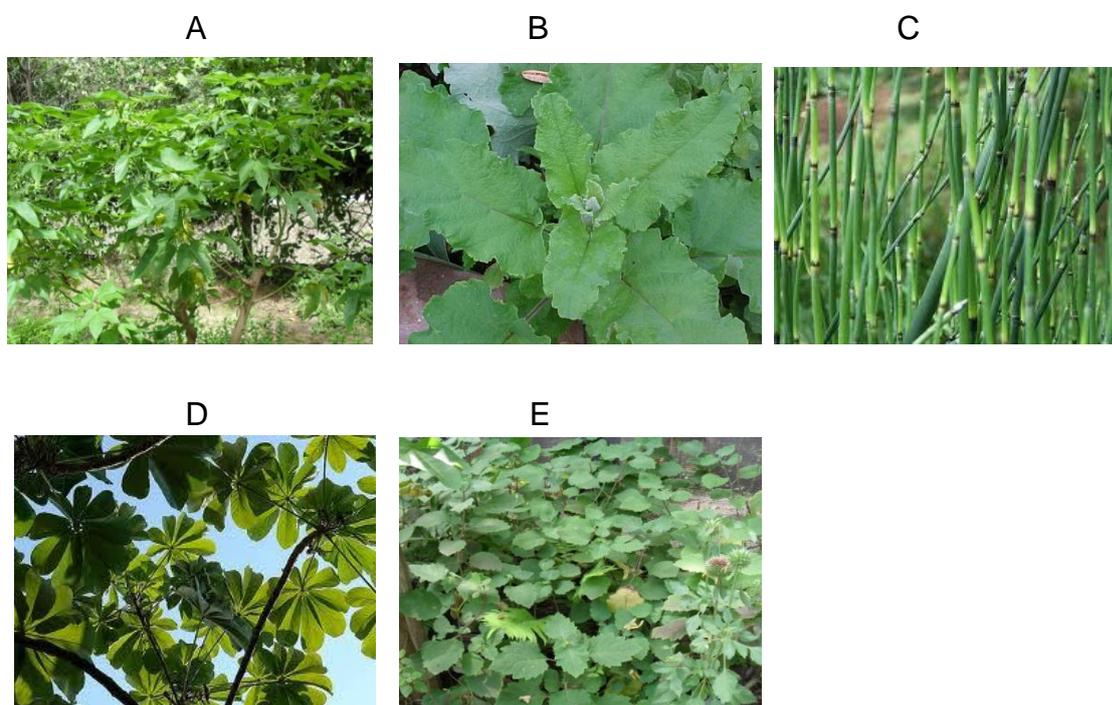


Figura 5 – Espécies vegetais selecionadas: A) *Gossypium hirsutum* L.(Malvaceae); B) *Arctium lappa* (Asteraceae); C) *Equisetum* sp. (Equisetaceae); D) *Cecropia pachystachya* Trécul. (Cecropiaceae); E) *Pogostemon heyneanus* (Lamiaceae)

De acordo com a literatura, a utilização de extratos naturais é promissora e os estudos da atividade antimicrobiana devem ser ampliados para oferecer a perspectiva da descoberta de novos extratos potentes e compostos bioativos alternativos aos agentes antimicrobianos existentes.

4 METODOLOGIA

4.1 Plantas

4.1.1 Identificação e coleta

As plantas *Gossypium hirsutum* L., *Arctium lappa*, *Equisetum* sp., *Cecropia pachystachya* Trécul. e *Pogostemon heyneanus* foram coletadas no Viveiro de Plantas Medicinais da Prefeitura Municipal de Vitória. O material botânico foi identificado pela Prof^a Dr^a Luciana Dias Thomaz (Departamento de Botânica) com depósito de exsicata no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o número de Tombo 26419, 26420, 26421, 26423 e 26422 respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Plantas selecionadas

Nome Científico	Nome Popular	Família	Parte Utilizada
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Algodão	Malvaceae	Folhas
<i>Arctium lappa</i>	Bardana	Asteraceae	Folhas
<i>Equisetum</i> sp.	Cavalinha	Equisetaceae	Partes aéreas
<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.	Embaúba	Cecropiaceae	Folhas
<i>Pogostemon heyneanus</i>	Patchouli	Lamiaceae	Folhas

4.1.2 Obtenção dos extratos brutos

As folhas das espécies *Gossypium hirsutum* L. *Arctium lappa*, *Equisetum* sp., *Cecropia pachystachya* Trécul. e *Pogostemon heyneanus* foram coletadas, secas e moídas separadamente. O pó obtido foi submetido à extração através de maceração com etanol. As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e concentradas em rota- evaporador sob pressão reduzida a 80° C. Ao final desse processo, os extratos brutos foram mantidos em geladeira a 4° C até serem utilizados (Figura 6 - A/B).

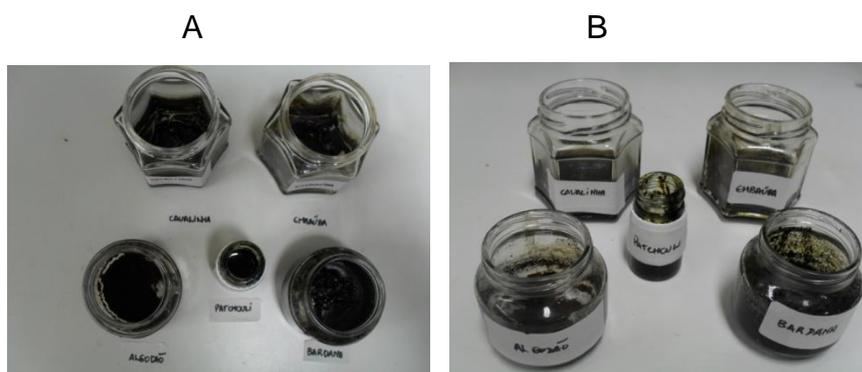


Figura 6 (A/B) - Extratos brutos das plantas selecionadas

4.1.3 Diluição dos extratos

Partindo do peso seco do extrato, preparou-se as soluções estoque (SE) diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO), de modo a se obter a concentração de 5000 µg/mL. Os extratos diluídos foram homogeneizados em vórtex até dissolução completa. A partir da SE de 5000 µg/mL, foi preparada uma nova solução (Figura 7) adicionando-se água destilada estéril para uma concentração final de 1000 µg/mL (diluição 1:5), considerada como Diluição 1 (D1). A partir dessa solução D1 obteve-se uma diluição sequencial em escala 2, até a décima diluição, onde a concentração do extrato era de 1,95 µg/mL. Para avaliar a ação do solvente foi preparada uma solução D1 de DMSO em

água destilada estéril com concentração de 20% (v/v) ou 1:5, que também foi posteriormente diluída como os extratos.

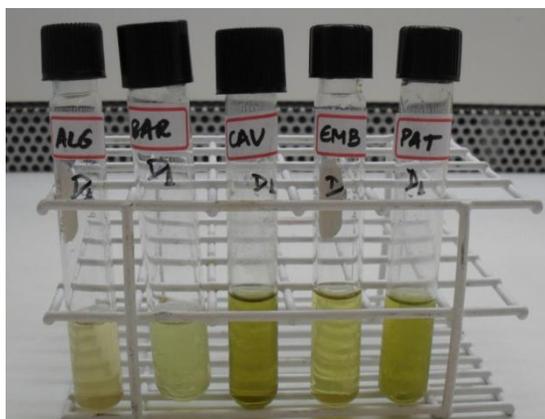


Figura 7- Diluição 1 (D1) dos extratos : ALG (*Gossypium hirsutum* L.), BAR (*Arctium lappa*), CAV (*Equisetum* sp.), EMB (*Cecropia pachystachya* Trécul.), PAT (*Pogostemon heyneanus*).

4.2 Antissépticos bucais

Foram utilizados os antissépticos bucais comerciais relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Antissépticos bucais utilizados nos testes.

Produto	Princípio Ativo
Cepacol® Cool Ice (Sanofis, Brasil)	Cloreto de Cetilpiridínio 0,500mg
Listerine® Cool Mint (Johnson & Johnson, Brasil)	Timol, Eucaliptol, Mentol, Salicilato de Metila
Periogard® sem álcool (Colgate, Brasil)	Gluconato de clorexidina 0,12%
Plax® Whitening (Colgate, Brasil)	Peróxido de Hidrogênio 1,5%

4.3 Meios de Cultura

O meio utilizado para os testes de microdiluição em caldo foi o RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) tamponado em MOPS [ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico]. Os meios utilizados para a semeadura prévia aos ensaios foram o ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) (Anexo 1).

4.4 Microrganismos

Foram utilizadas 62 isolados clínicos (mucosa oral: 25; mucosa vaginal: 06; sangue: 20; trato urinário:11) de *Candida albicans* pertencentes à coleção mantida congelada a -70 °C no Núcleo de Doenças Infecciosas (UFES). Nos experimentos de biofilme foi também utilizada a cepa padrão de *Candida albicans* da American Type Culture Collection (ATCC®) número 90028, gentilmente cedida pelo Drº Wander José da Silva, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Universidade Estadual de Campinas).

Para confirmar a identificação, as leveduras foram descongeladas e cultivadas em ASD e posteriormente em meio cromogênico CHROMagar Candida®. Isolados que cresceram com formação de colônias de coloração verde foram confirmadas como espécies de *Candida albicans*.

4.5 Atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos bucais (baseado no método de microdiluição em caldo - Documento M27-A3, CLSI, 2008)

4.5.1 Preparo do inóculo

Foram utilizados 15 isolados clínicos (08 isolados produtores de biofilme e 07 isolados não produtores de biofilme) nos testes de microdiluição com extratos e antissépticos. As células foram previamente cultivadas em ASD a 35° C por 24

horas. Após o tempo de incubação, foram coletadas com alça bacteriológica 5 colônias de aproximadamente 1mm de diâmetro para preparo de uma suspensão em 5mL de água destilada estéril. A suspensão foi agitada por vórtex por 15 segundos e a densidade celular foi ajustada por leitura espectrofotométrica para escala 0,5 de MacFarland, equivalente a transmitância entre 85-90% em comprimento de onda de 530 nm e correspondendo à concentração de 1 a 5×10^6 células/mL. A suspensão utilizada no teste foi preparada por posterior diluição a 1:50 em água destilada estéril, seguida de diluição 1:20 em meio RPMI 1640 . A concentração final testada foi de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

4.5.2 Extratos vegetais

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos, foram realizadas diluições seriadas destes em caldo RPMI 1640, em microplacas de 96 poços. Na coluna 1 foram colocados 200 μ L do extrato preparado da diluição 1 (D1). Nas colunas 2 a 10 foram colocados 100 μ L do meio RPMI 1640; a seguir foram realizadas diluições seriadas (escala 2) transferindo 100 μ L do extrato da coluna 1 até a coluna 10, quando descartou-se 100 μ L. Após as diluições estarem completas foram acrescentados 100 μ L do inóculo (preparado de acordo com o item 4.5.1) nos poços 1 ao 10. Na coluna 11 foram colocados 100 μ L do meio RPMI 1640 e 100 μ L do inóculo como controle positivo e na coluna 12 apenas 200 μ L de RPMI 1640 como controle negativo (Figura 8). Em uma fileira horizontal foi adicionado apenas o veículo (DMSO), onde foram realizadas as mesmas diluições descritas acima, como controle da ação do veículo. A seguir, foram acrescentados 100 μ L de inóculo, conforme descrito no item 4.5.1. Os testes foram realizados em duplicata. Após incubação por 24 horas a 35°C, a CIM do extrato foi determinada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico.

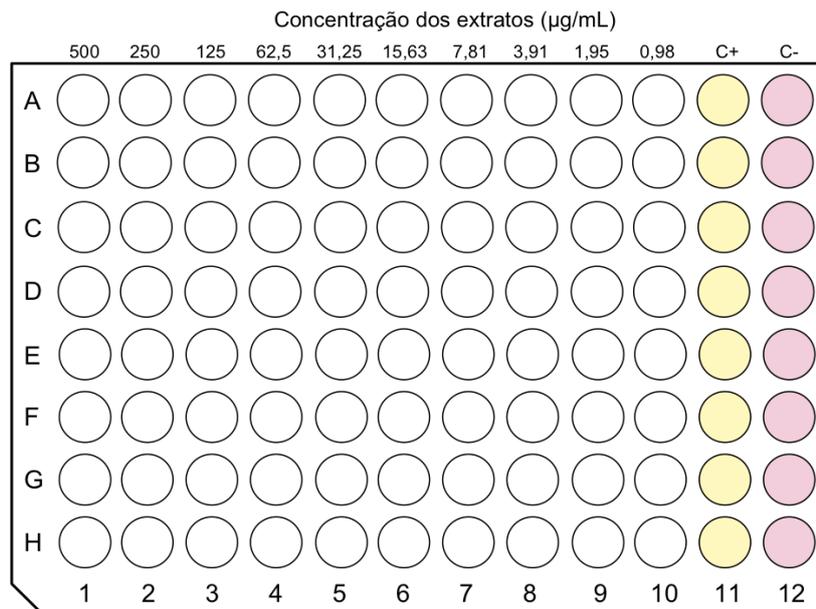


Figura 8 - Distribuição e concentração final dos extratos nas microplacas .
C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo)

4.5.3 Antissépticos bucais

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), diluições seriadas dos antissépticos foram preparadas em microplacas de 96 poços, com caldo RPMI 1640. Na coluna 1, foram colocados 200 μL do antisséptico na concentração comercial. Nas colunas 2 a 10, foram colocados 100 μL do meio RPMI 1640; a seguir foram realizadas diluições seriadas (escala 2) transferindo 100 μL do antisséptico da coluna 1 até a coluna 10, quando descartou-se 100 μL . Após as diluições estarem completas foram acrescentados 100 μL do inóculo, obtido conforme item 4.5.1, nos poços 1 ao 10. Na coluna 11, foram colocados 100 μL do meio RPMI 1640 e 100 μL do inóculo como controle positivo e na coluna 12 apenas 200 μL de RPMI 1640 como controle negativo (Figura 9). Os testes foram realizados em duplicata. Após incubação por 24 horas a 35°C a CIM do antisséptico foi determinada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico.

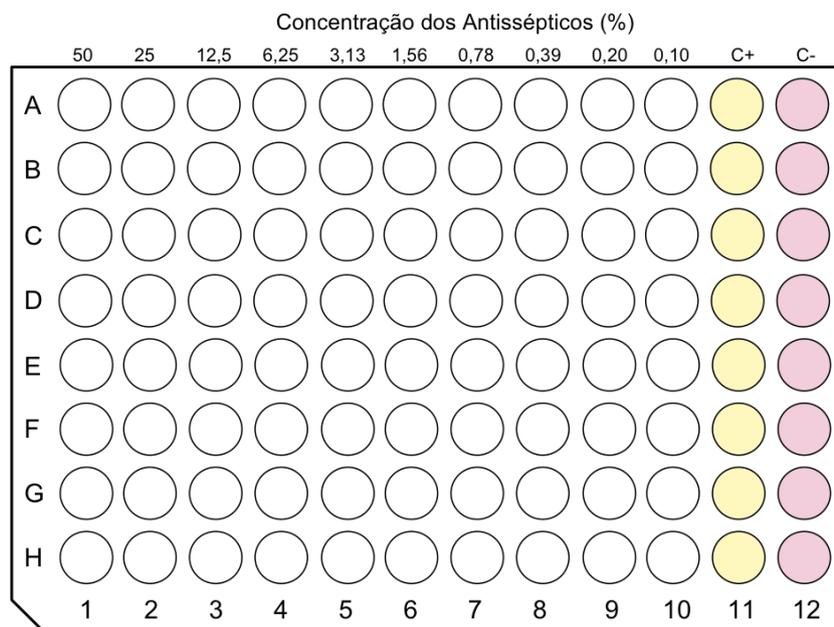


Figura 9 - Distribuição e concentração final dos antissépticos nas microplacas .
C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo)

4.6 Biofilme

4.6.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado segundo Pierce et al. (2008) com algumas modificações. Antes de cada ensaio, os isolados foram cultivados em ASD a 37° C por 24 horas. Com auxílio de alça bacteriológica foram coletadas cerca de 5 colônias (com aproximadamente 1 mm de diâmetro), inoculadas em balão contendo 20mL de caldo YPD e cultivadas em incubadora orbital com 120 rpm a 35°C por 18 horas (*overnight*). Ao fim das 18 horas de crescimento, as células foram submetidas a um processo de lavagem em que a suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm. Após remoção do sobrenadante, as células foram lavadas 2 vezes com PBS (solução salina tamponada) gelado. O “pellet” foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 pré-aquecido a 37°C de modo a se obter uma suspensão com concentração final de 1.0×10^6 células/mL, equivalente à densidade óptica (DO) de 0,1, ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm.

4.6.2 Formação de biofilme

Foram utilizados 62 isolados clínicos nos testes de formação de biofilme. Foram colocados 200 μ L do inóculo em microplacas com 96 poços, tendo como controle negativo 200 μ L de RPMI 1640 e como controle positivo a cepa padrão ATCC® 90028. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação, o meio foi aspirado cuidadosamente e os poços foram lavados 3 vezes com 200 μ L de PBS estéril para remover as células não aderidas. As microplacas foram invertidas sobre papel toalha para remover o excesso de líquido, e depois foram deixadas por 20 minutos a temperatura ambiente para secar. A seguir foram colocados 200 μ L do corante safranina 0,1% por 15 minutos. O corante foi descartado e as placas foram lavadas por imersão em água destilada, e deixadas por 1 hora à temperatura ambiente para secar. Para solubilizar o corante, foram acrescentados 100 μ L de álcool-éter 97% (v/v) e 100 μ L de PBS. A leitura da DO foi realizada em leitor de ELISA (Thermoplate Reader) em comprimento de onda de 492nm. Foi estabelecido como ponto de corte ("cut-off") a média dos valores do controle positivo. Os isolados que apresentaram valores iguais ou superiores à média dos valores do controle positivo foram considerados produtores de biofilme; e os que apresentaram valores inferiores foram considerados como não produtores de biofilme.

4.6.3 Ensaio de inibição de formação de biofilme com antissépticos bucais

A capacidade de inibição de formação de biofilme (antiadesão) dos antissépticos bucais foi avaliada nos isolados clínicos classificados como produtores de biofilme (Anexo 4). Os antissépticos foram testados individualmente em microplacas e distribuídos em diluições. Na coluna 1, foram colocados 200 μ L do antisséptico na concentração comercial. Nas colunas 2 a 9, foram colocados 100 μ L do meio RPMI 1640; a seguir foram realizadas diluições seriadas (escala 2) transferindo 100 μ L do antisséptico da coluna 1

até a coluna 9, quando descartou-se 100 μ L. Após as diluições estarem completas foram acrescentados 100 μ L do inóculo, obtido conforme item 4.6.1, nos poços 1 ao 9. Na coluna 10 e 11, foram colocados 100 μ L do meio RPMI 1640 e 100 μ L do inóculo como controle positivo e na coluna 12 apenas 200 μ L de RPMI 1640 como controle negativo (Figura 10). A cepa padrão ATCC® 90028 foi usada como controle positivo para formação de biofilme. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

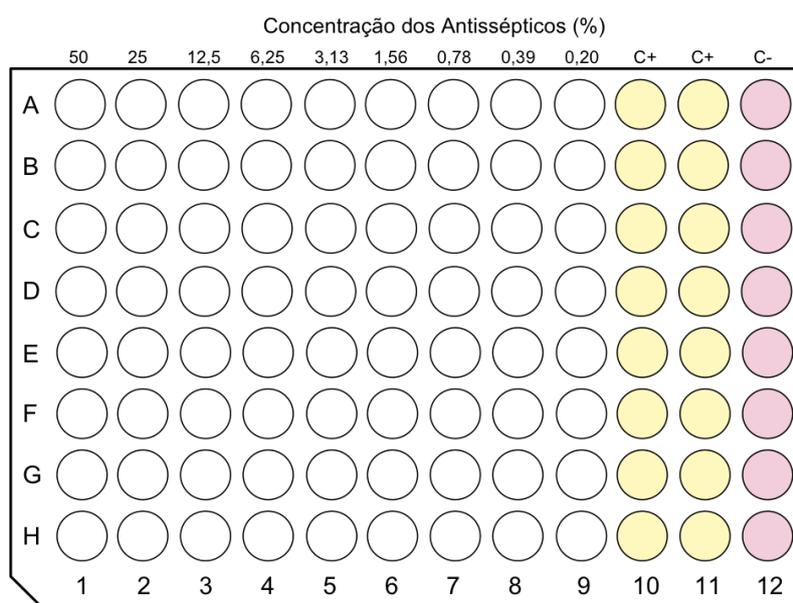


Figura 10- Distribuição e concentração final dos antissépticos nas microplacas (ensaio de inibição de formação de biofilme).

C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo)

4.7. Análise dos dados

Para a análise dos dados, foi utilizado o teste de variância ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis) com o auxílio do programa GraPhad Prism 5.0b. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Massa dos extratos obtidos

As massas dos extratos brutos obtidos e seus rendimentos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento dos extratos brutos das espécies avaliadas

Planta	Massa da planta (g)	Massa do extrato obtido (g)	Rendimento do extrato (%)
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	68,85	7,41	10,76
<i>Arctium lappa</i>	88,58	8,08	9,12
<i>Equisetum</i> sp.	195,63	2,72	1,39
<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.	103,66	19,88	19,18
<i>Pogostemon heyneanus</i>	55,19	5,91	10,70

5.2 Testes de microdiluição

5.2.1 Atividade antifúngica (CIM - µg/mL) de extratos e antissépticos

A leitura do teste foi realizada por comparação visual do crescimento da levedura ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas de extratos e antissépticos com o seu crescimento no poço-controle positivo, adotando-se 100% de inibição para determinação de CIM.

A Figura 11 mostra que o extrato de *Gossypium hirsutum* L. apresentou valores de CIM entre 250 e 62,5 µg/mL; os extratos de *Arctium lappa* e *Equisetum* sp. 250 µg/mL; o extrato de *Pogostemon heyneanus* entre 125 e 62,5 µg/mL e os

menores valores de CIM foram observados para o extrato de *Cecropia pachystachya* Trécul., entre 7,81 e 3,91 $\mu\text{g/mL}$. O solvente DMSO inibiu o crescimento fúngico até a concentração de 10%(v/v), equivalente a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos, e considerou-se que os valores de CIM abaixo desta concentração não sofreram interferência da ação do solvente.

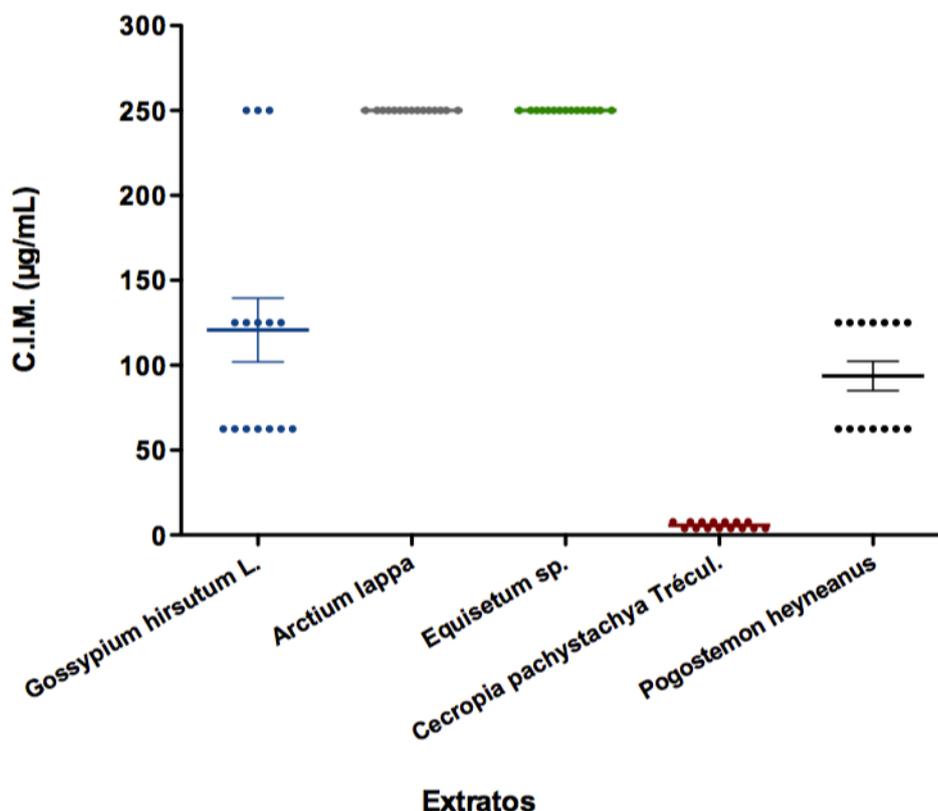


Figura 11- Valores de CIM (em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos vegetais.

A Figura 12 mostra que os antissépticos Cepacol® Cool Ice e Periogard® apresentaram os menores valores de CIM, entre 0,20 e 0,10%; Plax® Whitening variou entre 1,56% e 0,39% e Listerine® Cool Mint apresentou valores entre 6,25% e 0,39%. As diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$) revelaram que os antissépticos bucais Cepacol® Cool Ice e Periogard® apresentaram os melhores resultados.

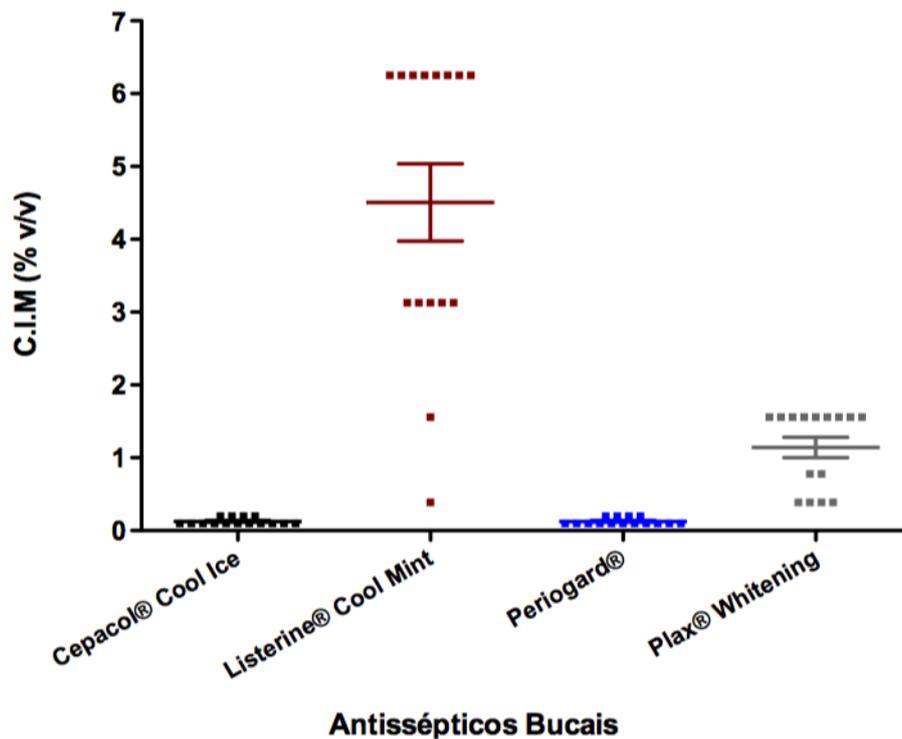


Figura 12- Valores de CIM (%) dos antissépticos bucais.

5.3 Biofilme

5.3.1 Formação e quantificação de biofilme

Dos 62 isolados clínicos testados, apenas os 19 isolados que apresentaram valores iguais ou superiores à média dos valores do controle positivo (cepa padrão) foram considerados produtores de biofilme (Figura 13). Os isolados que apresentaram valores inferiores à média dos valores do controle positivo (cepa padrão) foram considerados como fracamente produtores ou não produtores de biofilme (Anexo 4).

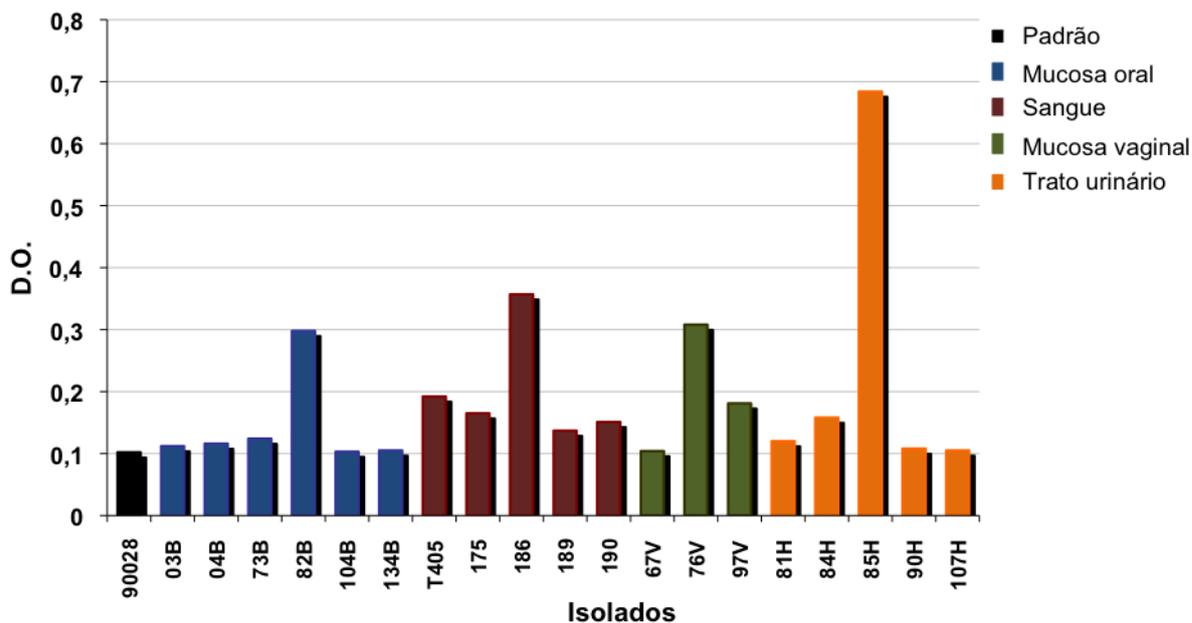


Figura 13- Isolados clínicos de *C. albicans* produtores de biofilme.

5.3.2 Inibição de formação de biofilme

Foram considerados os valores de CIM dos antissépticos bucais que inibiram 100% da formação de biofilme dos isolados clínicos. Nos casos em que ocorreu uma inibição parcial de formação de biofilme (menor que 100%), os resultados foram considerados negativos. Dos 19 isolados clínicos, 4 não foram inibidos por nenhum dos produtos testados, 4 foram inibidos apenas por 1 produto e 1 foi inibido por 2 produtos (Anexo 5).

A CIM de Cepacol® Cool Ice ficou entre 0,39% e 0,20% para 8 isolados e entre 25% e 12,5% para 4 isolados clínicos (Figura 14). Listerine® Cool Mint (Figura 15) obteve CIM entre 0,39% e 0,20% para 8 isolados, 3,13% para 1 isolado e 12,5% para 2 isolados clínicos.

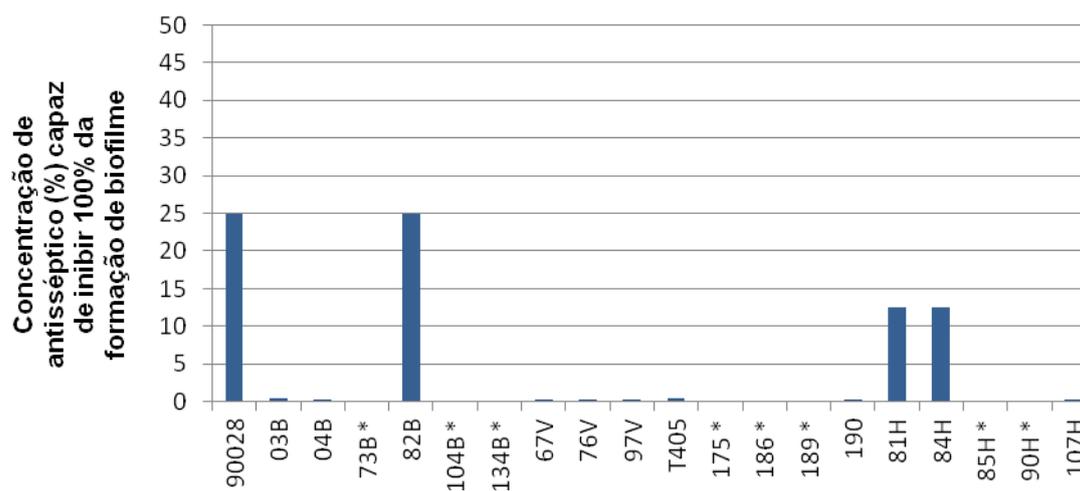


Figura 14- Cepacol® Cool Ice

(*) negativo ou inibição menor que 100%

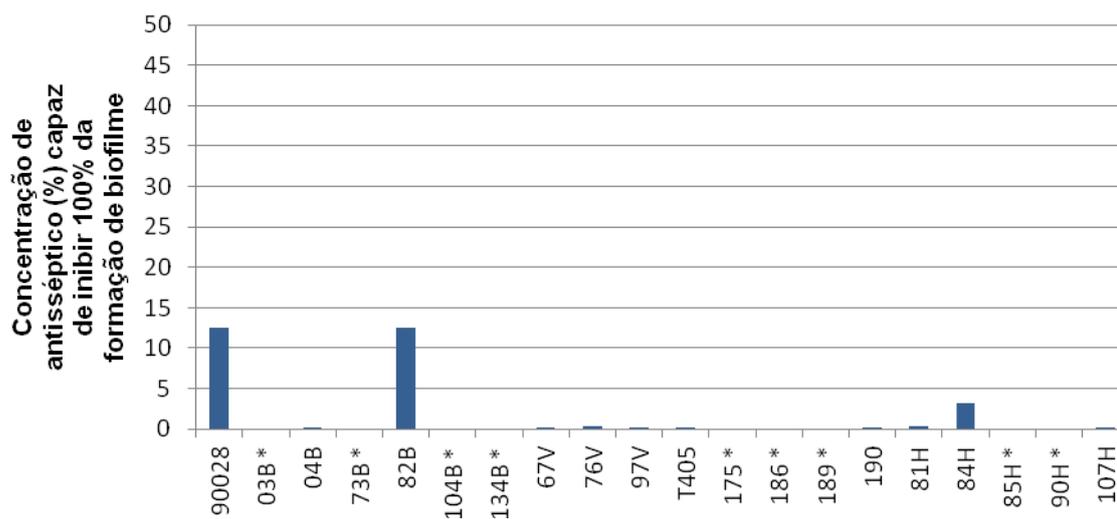


Figura 15- Listerine® Cool Mint

(*) negativo ou inibição menor que 100%

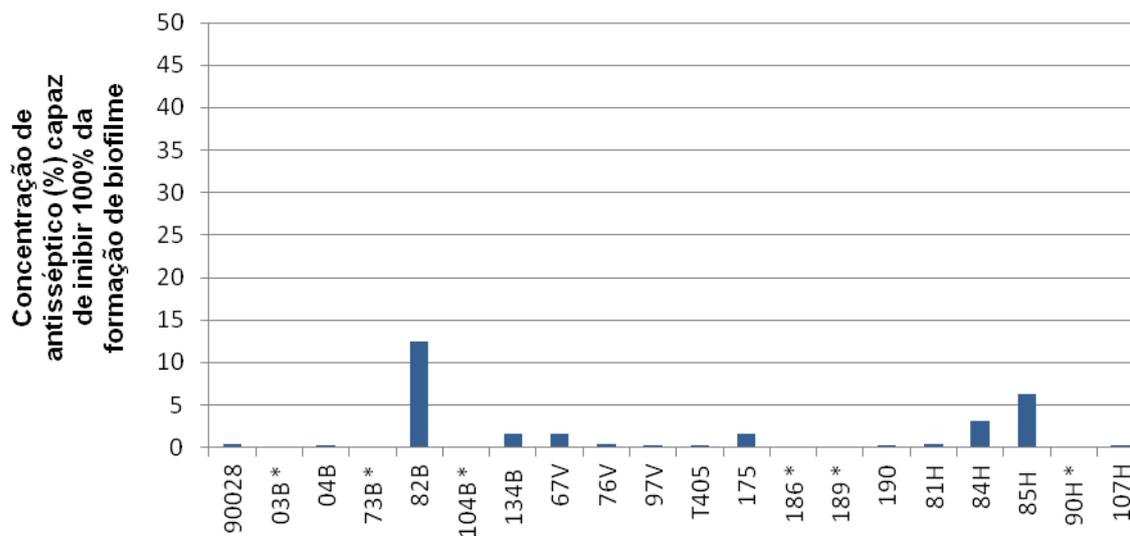


Figura 16- Periogard®

(*) negativo ou inibição menor que 100%

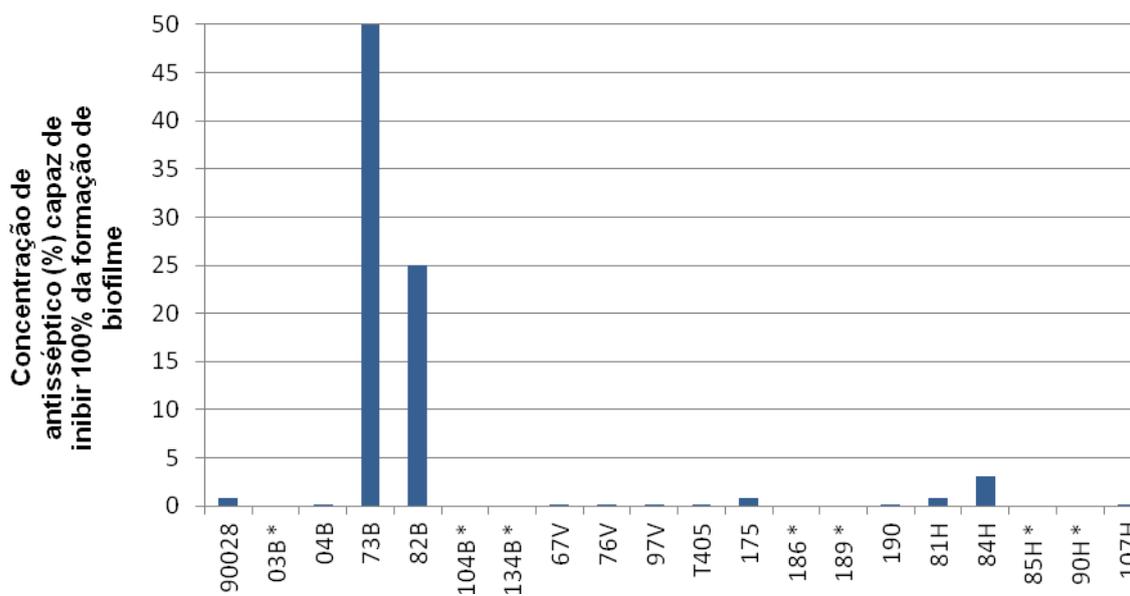


Figura 17- Plax® Whitening

(*) negativo ou inibição menor que 100%

A CIM de Periogard® ficou entre 0,39% e 0,20% para 7 isolados, 1,56% para 4 isolados, 6,25% e 3,13% para 2 isolados (Figura 16). Plax® Whitening obteve CIM entre 0,78% e 0,20% para 10 isolados, 3,13% para 1 isolado e 50% e 25% para 2 isolados clínicos (Figura 17).

Em relação à inibição de formação de biofilme, não houve diferenças estatísticas entre os antissépticos bucais analisados (Kruskal-Wallis, $p=0,6915$).

6. DISCUSSÃO

A capacidade de *Candida albicans* para colonizar materiais dentários formando biofilme é importante no desenvolvimento da estomatite associada à prótese, embora a levedura possa ser encontrada na prótese e mucosa oral de indivíduos sem quaisquer sinais clínicos dessa infecção (Abbeele et al., 2008). Ramage et al. (2004) utilizaram microscopia eletrônica de varredura para demonstrar a capacidade de adesão de *C. albicans* ao longo das imperfeições e fissuras na superfície das próteses dentárias. As formas filamentosas profundamente aderidas à superfície constituem, em parte, fator de resistência do biofilme à terapia antifúngica.

A eficácia da terapia antifúngica no tratamento de estomatite associada à prótese pode ser limitada nos casos em que o biofilme não seja completamente removido. A recorrência da infecção pode manifestar-se após a interrupção do tratamento antifúngico por recontaminação da superfície da prótese, assim a limpeza rigorosa das próteses é necessária para o tratamento e prevenção da estomatite associada à prótese. Chandra et al. (2001) relataram que anfotericina, nistatina, clorexidina e fluconazol reduziram em até 8 vezes a capacidade de inibir o crescimento de células de *C. albicans* cultivadas de biofilmes formados em superfícies de materiais dentários *in vitro*, em relação aos seus efeitos sobre células provenientes de culturas simples.

A associação de higienização inadequada de prótese e estomatite foi mostrada por Pires et al. (2002) que constataram significativa melhora clínica após a substituição das próteses. Entre 39 indivíduos usando próteses totais e com estomatite protética, mais de 80% não realizavam higienização eficiente das próteses, e 100% apresentaram colonização de suas próteses e mucosa oral por *C. albicans*. A estomatite protética foi eliminada em quase dois terços dos indivíduos nos 6 meses posteriores à instalação de novas próteses e execução de práticas corretas de higiene.

Em nosso trabalho todos os antissépticos bucais analisados (Cepacol® Cool Mint, Listerine® Cool Mint, Periogard® e Plax® Whitening) apresentaram ação antifúngica frente aos isolados de *C. albicans*. Entretanto, Cepacol® Cool Ice e Periogard® apresentaram os melhores resultados com valores de CIM entre 0,20 (26,7% dos isolados) e 0,10% (73,3% dos isolados). Os fabricantes recomendam o uso das formulações puras e em nosso trabalho o maior valor de CIM encontrado foi de 6,25% que representa a diluição do produto em 1:16.

O cloreto de cetilpiridínio, princípio ativo do Cepacol® Cool Ice, teve sua ação antimicrobiana previamente relatada na literatura (Bugno et al., 2006; Alves et al., 2012), o que confirma os nossos resultados. Em trabalho realizado por Rocha et al. (2006) Cepacol® apresentou valores de CIM entre 0,003 e 0,025µg/mL para leveduras isoladas da cavidade bucal de adultos portadores de HIV.

Matos et al. (2009) encontraram valores de Máxima Diluição Inibitória (MDI) para a solução à base de clorexidina de 0,12%, variando entre 0,2% e 0,1% para 72,7% dos isolados de *C. albicans* analisados. O poder antimicrobiano da clorexidina sobre *Candida* spp. é relatado na literatura (Ellepola & Samaranayake, 2000; Ramage et al., 2011). Maekawa et al.(2010) avaliaram a atividade de antissépticos bucais à base de clorexidina sem álcool em comparação ao controle com álcool sobre isolados de *C.albicans* e não encontraram diferenças estatísticas entre os grupos.

A ação fungistática de Listerine® Cool Mint foi observada em concentrações maiores que os outros produtos testados neste trabalho. Os valores de CIM encontrados foram de 6,25% (53,3% dos isolados), 3,13% (33,3% dos isolados), 1,56% e 0,39% (6,7% dos isolados respectivamente). Nossos resultados estão parcialmente de acordo com Toti-Rodrigues (2008) que analisando diferentes metodologias para testes de suscetibilidade de antissépticos bucais frente a espécies do gênero *Candida* encontrou valores de CIM de Listerine® entre 5 e 50%, maiores que os outros antissépticos avaliados. Meiller et al. (2001) obtiveram valores mais altos de CIM para o

Listerine® empregando a metodologia de macrodiluição em caldo frente às espécies de *Candida*.

O peróxido de hidrogênio tem sua ação antifúngica discutida na literatura, pois apresenta resultados controversos. Nossos resultados mostraram que o antisséptico Plax® Whitening apresentou valores de CIM entre 1,56% (60% dos isolados) e 0,39% (26,7% dos isolados). No trabalho de Matos et al. (2009) a solução comercial à base desse agente apresentou Máxima Diluição Inibitória (MDI) de 0,78% para 86,35% das amostras. Modesto et al. (2000) relataram resultados significativos do peróxido de hidrogênio a 3% sobre *C. albicans in vitro* e sobre biofilme dentário.

Estudos sobre a atividade de antiadesão são importantes para demonstrar a capacidade de um antimicrobiano para controlar infecções associadas a biofilmes formados em superfícies artificiais ou biológicas. Embora a capacidade de *C. albicans* para formar hifas seja essencial para o desenvolvimento de biofilmes, nem todos os isolados clínicos são capazes de formar biofilmes com níveis equivalentes. Em nosso trabalho foi avaliada a capacidade de formação de biofilme de 62 isolados clínicos de *C. albicans*, dos quais apenas 19 foram classificados como formadores de biofilme quando comparados a uma cepa padrão.

Em relação a inibição de formação de biofilmes, consideramos apenas os valores de CIM que inibiram 100% da formação de biofilme. Nossos resultados revelaram que as CIM de Cepacol® Cool Ice entre 25% e 0,20%; Listerine® Cool Mint entre 12,5% e 0,20%; Periogard® entre 6,25% e 0,20% e Plax® Whitening entre 50% e 0,20% foram inibitórias. Embora a metodologia utilizada em nosso trabalho tenha analisado a inibição da biomassa do biofilme, os dados mostram certa concordância com estudos que avaliam a redução da viabilidade celular em biofilmes.

Ramage et al. (2011) demonstraram que os antissépticos bucais Corsodyl® (clorexidina 0,2%) e Listerine® têm a capacidade de reduzir a viabilidade de biofilmes pré-formados *in vitro* em 80% após enxague de 30-60 segundos, de

acordo com as recomendações de cada fabricante. Estudos anteriores relataram dados semelhantes, onde clorexidina a 0,12% e Listerine® mostraram ser eficazes contra biofilmes de fungos (Meiller et al., 2001; Shapiro et al., 2002). Pusateria et al. (2009) demonstraram que discos de acrílico previamente tratados com clorexidina a 0,12% tiveram uma redução significativa no crescimento do biofilme de *C. albicans* em sua superfície ao longo de todo o curso de 72 horas.

Nosso estudo mostrou que cerca de 50% dos isolados da mucosa oral formadores de biofilme tiveram inibição na formação de biofilme pelos antissépticos bucais e, dentre estes, Periogard® obteve os melhores resultados, o que demonstra concordância com seus resultados nos testes de inibição de células planctônicas de *C. albicans*. Todos os isolados de mucosa vaginal formadores de biofilme foram inibidos pelos antissépticos bucais, com o melhor resultado obtido por Cepacol® Cool Ice. A maioria dos isolados do sangue e trato urinário formadores de biofilme não foram inibidos por antissépticos bucais. A eficácia dos antissépticos bucais contra biofilmes de isolados de mucosa oral de *Candida albicans in vitro* sugere que os ensaios clínicos devem ser projetados para estabelecer seu papel no manejo clínico de candidíase oral.

Os componentes ativos nos antissépticos bucais têm amplo espectro de atividade antimicrobiana, através da ruptura da membrana e, ao contrário dos azólicos e polienos, sua ação não está relacionada com o ergosterol da membrana celular e consequente toxicidade. Entretanto existem algumas desvantagens para o a utilização de antissépticos bucais como coloração superficial de esmalte e também da prótese dentária, sensação de ardor e alterações do paladar. Muitos deles também têm um elevado teor de álcool, que pode ser contraindicado em algumas situações específicas. Como resultado, os compostos alternativos têm atraído a atenção dos pesquisadores.

A eficácia antimicrobiana atribuída a algumas plantas no tratamento de doenças tem sido corroborada por dados na literatura científica (Lubian et al., 2010; Molina et al., 2008). Devido à sua utilização popular como remédios para

muitas doenças infecciosas (Fenner et al., 2006), pesquisas de plantas que contenham substâncias antimicrobianas são frequentes.

Neste trabalho utilizamos o solvente DMSO para solubilizar os extratos vegetais, e sua ação antimicrobiana interferente foi analisada durante a realização dos ensaios. A concentração deste agente que interferiu no crescimento foi de 10% (v/v), encontrada apenas no poço 1. Assim foram consideradas as inibições que ocorreram a partir do poço 2 .

Em nossos trabalho os extratos avaliados apresentaram os seguintes valores de CIM: *Gossypium hirsutum* L. 250 a 62,5 µg/mL; *Arctium lappa* e *Equisetum* sp. 250 µg/mL; *Cecropia pachystachya* Trécul. 7,81 a 3,19 µg/mL; e *Pogostemon heyneanus* 125 a 62,5µg/mL. Concluimos que todos os extratos apresentaram ação antifúngica, mesmo em concentrações maiores, e que os resultados de *Cecropia pachystachya* Trécul revelaram-se promissores para estudos de profilaxia ou terapia alternativa para candidíase oral, principalmente para utilização na descontaminação de próteses dentárias. Sua atividade pode convertê-lo em uma alternativa promissora para o tratamento tópico da candidíase oral e estomatite associada à prótese. No entanto potenciais efeitos tóxicos de alguns destes compostos devem ser considerados.

Nossos resultados estão de acordo com estudos conduzidos para avaliar o efeito de extratos das duas espécies de “bardana” (*Arctium minus* e *Arctium lappa*) que evidenciaram atividades biológicas variadas, incluindo atividade antifúngica e antibacteriana (Ferracane et al., 2010). Lubian et al. (2010) demonstraram que o extrato aquoso das folhas de *Arctium minus* possui efeito fungistático *in vitro* contra espécies orais de *Candida* spp.

Segundo Bertalot et al. (2010) o preparado de *Equisetum* sp. é muito eficaz para evitar fungos em substratos de mudas para horticultura. Garcia et al.(2010) realizaram pesquisa etnofarmacológica entre os migrantes que vivem na Mata Atlântica do sudeste de Diadema, São Paulo, e relataram o uso de *Equisetum arvensis* L. como diurético e *Gossypium* sp. como anti-inflamatório, entretanto essas atividades ainda não foram confirmadas por estudos

farmacológicos. Estas espécies devem ser alvo de investigações futuras, porque a manutenção do uso durante as migrações humanas pode ser indicativo de potencial bioativo.

Pogostemon sp. é popularmente utilizado no tratamento de eczema, dermatite inflamatória, micoses, acne, e como cicatrizante de feridas. No trabalho de Côrrea & Gonçalves (2010) com óleos essenciais de plantas aromáticas foi possível constatar que a espécie *Pogostemon cablin* não apresentou ação antifúngica contra espécies de *Candida*.

Estudos confirmam o efeito antioxidante que o ácido clorogênico presente na *Cecropia pachystachya* Trécul. possui ao reduzir o estresse oxidativo e proteger contra danos nos tecidos em diabetes (Chan et al., 2012; Aragão et al., 2010). A seiva da "embaúba" foi relatada como tóxica, mas seus frutos são usados para combater a bronquite (Garcia et al., 2010). Outras pesquisas relatam que esta espécie possui atividade cardiotônica, sedativa (Consolini et al., 2006) e anti-inflamatória (Schinella et al., 2008).

Pesquisas sobre aplicação clínica de extratos vegetais no tratamento de candidíase oral mostram resultados promissores. Sabzghabae et al. (2012) realizaram um estudo randomizado com 80 pacientes que utilizaram gel de *Satureia hortensis* a 1% ou placebo para o tratamento de estomatite protética por 14 dias consecutivos. O grupo de intervenção apresentou melhora significativa de eritema na mucosa e contagem de colônias de *Candida* spp. em relação ao grupo controle, demonstrando que esse agente pode ser eficaz para o tratamento de estomatite associada à prótese.

Alguns fatores ambientais envolvidos no momento da coleta da planta devem ser considerados como: sazonalidade, clima, tipo de solo e temperatura do ar. A produção de metabólitos secundários pela planta ocorre em função da interação planta *versus* ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos. Este fato pode explicar resultados divergentes de extratos da mesma espécie, mas coletado em locais e períodos diferentes. Todos os extratos testados neste estudo foram obtidos a partir de espécies vegetais colhidas em única estação

do ano (primavera), em único período do mês (novembro de 2010) e da mesma localidade do município de Vitória.

Concluimos que extratos em concentrações superiores associadas ao maior número de linhagens de *Candida albicans* são necessários, com a finalidade de obter resultados mais robustos sobre o efeito dos extratos vegetais sobre esta espécie. Ressaltamos ainda que este estudo corrobora a importância dos dados de levantamentos etnofarmacológicos na seleção de plantas para triagem de bioatividade.

A alta prevalência de estomatite protética entre usuários de prótese total e sua associação com a falta de adequada higiene de próteses sugere que apenas uma minoria de usuários de próteses realmente pratica a limpeza rigorosa de suas próteses. Entre os fatores envolvidos estão dificuldades motoras para executar a higienização (indivíduos com idade avançada), custo elevado dos produtos disponíveis no mercado e fatores psicossociais que impedem a remoção das próteses por períodos prolongados.

Estratégias para impedir o desenvolvimento de biofilme em próteses dentárias constituem a melhor abordagem para evitar a infecção, principalmente através de higienização usando agentes antimicrobianos alternativos. Esta abordagem evita repetidas exposições de leveduras aos azólicos e diminui o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos.

As pesquisas com extratos vegetais buscam novos produtos com atividade farmacológica, menor toxicidade e maior biocompatibilidade, e que apresentem custos mais acessíveis à população. A utilização de plantas medicinais tem como objetivo tornar-se uma conduta clínica criteriosa pela qual o profissional opta por ser eficaz, por provocar efeitos colaterais mínimos e por estar ao alcance de todos, como um recurso de baixo custo dentro de programas preventivos e curativos, incluindo os programas promovidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

7. CONCLUSÕES

Todos os extratos vegetais avaliados (*Gossypium hirsutum*, *Arctium lappa*, *Equisetum* sp., *Cecropia pachystachya* Trécul. e *Pogostemon heyneanus*) apresentaram ação antifúngica *in vitro* frente aos isolados de *C. albicans*.

Atividade antifúngica foi mais evidenciada com o extrato de *Cecropia pachystachya* Trécul. que apresentou os menores valores de CIM, em relação aos demais.

Todas as formulações comercializadas dos antissépticos bucais analisados (Cepacol® Cool Ice, Listerine® Cool Mint, Periogard® e Plax® Whitening) apresentaram ação antifúngica *in vitro* frente aos isolados de *C. albicans*.

Atividade antifúngica foi mais evidenciada com Cepacol® Cool Ice e Periogard®, que apresentaram os menores valores de CIM.

Todos os antissépticos bucais analisados foram capazes de inibir a formação de biofilme *in vitro* pela cepa padrão e pelos isolados de *C. albicans*, mas sem diferenças estatisticamente significantes entre estes produtos.

8. REFERÊNCIAS

Abbeele AV, de Meel H, Ahariz M. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology* 2008; 25: 222-228.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgraduate Med J* 2002; 78: 455-459.

Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 1770–1779.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiology* 2006; 55 (8): 999–1008

Almeida EC, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts. *J venom Anim Toxins* 2002; 2(8): 5-8.

Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac* 2012; 53(3): 181-189.

Andes D. *In vivo* pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1179- 1186.

Anvisa. [<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/iY>]

Aragão DM, Guariza L, Costa JC, Garcia RM, Scio E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 128: 629–633.

Bahna P, Hanna HA, Dvorak T, Vaporciyan A, Chambers M, Raad I. Antiseptic effect of a novel alcohol-free mouthwash: a convenient prophylactic alternative for high-risk patients. *Oral Oncol* 2007; 43: 159-64.

Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 397–403.

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, De Koninck L, Avon SL, Lalond B, Rompre P, Deslauries N. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 51–59.

Barrett AW, Kingsmill VJ, Speight PM. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis* 1998; 4: 26–31.

Bertalot MJA, Carvalho-Pupatto JG, Furtado EL, Rosa DD, Mendoza E, Lima AB. Métodos alternativos para controle de doenças fúngicas na cultura de jambu (*Spilanthes oleraceae* L.) através de *Equisetum* spp e preparado biodinâmico 501. *Rev Bras Agroecol* 2010; 5(2): 264-274.

Brandão MGL. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16: 408-420.

Brasil. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.*

Brasil. Portaria Interministerial nº 2960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília, DF, 2009.*

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio, MT. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2006; 65 (1): 40-45.

Campos MS, Marchini L, Bernardes LAS. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 419-424.

Carretto CFP. Atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida*. Dissertação de mestrado- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, 2007.

Chan GH, Ngoh GC, Yusoff R. A brief review on anti diabetic plants: Global distribution, active ingredients, extraction techniques and acting mechanisms *Pharmacogn Rev* 2012; 6 (11): 22–28.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res* 2001; 80: 903-908.

Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 5048–5052.

Consolini AE, Ragone MI, Migliori GN, Conforti P, Volonté MG. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *J Ethnopharmacol* 2006, 15:90-96.

Corrêa NB, Gonçalves GMS. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas aromáticas frente a diferentes espécies de *Candida*. Anais do XV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas, 2010.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 2003; 49: 711-745.

Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci* 2000; 57: 241-249.

Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97:351-358.

D'Auria FD, Tecca M, Scazzocchio F, Renzini V, Strippoli V. Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *J Chemother* 2003; 15 (5): 454-460.

Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 139-43

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003; 11: 30-36.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11: 172-98.

Eyerich K, Eyerich S, Hiller J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C. Chronic mucocutaneous candidiasis, from bench to bedside. *Eur J Dermatol* 2010; 20: 260 - 265.

Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev Bras Cienc Farmac* 2006; 42(3): 369- 394.

Ferracane R, Graziani G, Gallo M, Fogliano V, Ritieni A. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 51(2): 399-404

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of a etiological and predisposing factors – a large cohort. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 448-455.

Fischer DJ, Epstein JB. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. *Dent Clin North Am* 2008; 52: 39-60.

Gabrielson J, Hart M, Jarelöv A, Kühn I, McKenzie D, Möllby R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Methods* 2002; 50: 63–73.

Garcia D, Domingues MV, Rodrigues E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil *J Ethnobot Ethnomed* 2010; 6:29.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med Mycol* 2000; 38 (5): 355-362.

Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, Korpela R. Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly – a randomized controlled trial. *J Dent Res* 2007; 86: 125–130.

Hazen KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun* 1989; 57: 1894-1900.

Hikawczuk V J. Anti-inflammatory activity of natural compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *An Asociac Química Argentina* 1998; 86 (3-6): 167-170.

Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 176 -180.

Kantarciolu AS, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:44-48.

Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2006; 9: 668.

Knott A, Reuschlein, Mielke H, Wensorra U, Mummert C, Koop U, Kausch M, Kolbe L, Peters N, Stab F, Wenck H, Gallinat S. Natural *Arctium lappa* fruit extract improves the clinical signs of aging skin. *J Cosmet Dermatol* 2008; 7(4): 281- 289.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 608–611.

Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1546- 1554.

Kumar RS, Ganvir SM, Hazarey VK. *Candida* and calcofluor white: Study in precancer and cancer. *J Oral Maxillofac Pathol* 2009;13:2-8

LaFleur MD, Lucumi E, Napper AD, Diamond SL, Lewis K. Novel high-throughput screen against *Candida albicans* identifies antifungal potentiators and agents effective against biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 820-826.

Lee SY. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. *J Oral Sci* 2001; 43 (1):1-7.

Liu X, Hua H. Oral manifestation of chronic mucocutaneous candidiasis: seven case reports. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 528- 532.

Lopez-Ribot JL. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol* 2005; 15: R453–5.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda 2002; p 512-542.

Lubian CT, Teixeira JM, Lund RG, Nascente PS, Del Pino FAB. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. *Rev Bras PI Med*, 2010; 12 (2): 157-162.

Maciel MAM, Pinto CA, Veig JVF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 2002; 25 (3):429-38.

Maekawa LE, Brighenti FL, Lamping R, Oliveira LD, Marcacci S, Koga-Ito CY. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP* 2010; 39(1): 15-19.

Maia JGS, Zoghbi MGB, Andrade EHA. Plantas aromáticas da Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi 2001; 173p.

Martins ER. Plantas Medicinais. Viçosa: UFV, 2000; 219p.

Martins M, Uppuluri P, Thomas DP. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia* 2010; 169 (5): 323–331.

Matos BM, Oliveira LD, Jorge AOC, Balducci I, Koga-Ito CY. Comparação da atividade antimicrobiana de soluções de peróxido de hidrogênio e malva sobre *Candida albicans*. Cienc Odontol Bras 2009; 12(2): 24-28.

McCullough MJ, Savage NW. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. Aust Dent J 2005; 50: S36-9.

Meiller TF, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, Depaola LG, Baqui AA, Falkler WA Jr. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91:663-670.

Menegassi A, Wassermann GE, Olivera-Severo D, Becker-Ritt AB, Martinelli A H, Feder V, Carlini CR. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. J. Agric. Food Chem 2008; 56: 4399-4405.

Modesto A, Lima KC, de Uzeda M. Effects of solutions used in infants' oral hygiene on biofilms and oral microorganisms. ASDC J Dent Child. 2000; 67 (5): 338-344.

Molina FP, Majewski M, Perrela FA, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. Cienc Odontol Bras 2008; 11 (2): 86-93.

Morschhauser J. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. Med Microbiol Immunol 2010; 199: 165-172.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol 2004; 6: 915 - 926.

Nalbant AD, Kalkanci A, Filiz B, Kustimur S. Effectiveness of different cleaning agents against the colonization of *Candida* spp. and the *in vitro* detection of the adherence of these yeast cells to denture acrylic surfaces. Yonsei Med J, 2008; 49(4): 647-654.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral & Maxilofacial. 2ed: Guanabara Koogan 2004; p. 183-192.

Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 3805–3813.

Nikawa H. The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. Microb Ecol Health Dis 2003; 9: 35-48.

Nirale RM, Thombre R, Kubasad G. Comparative evaluation of sodium hypochlorite and microwave disinfection on dimensional stability of denture bases *Adv Prosthodont* 2012; 4(1): 24–29.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5421–5426.

Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B. *Farmacologia integrada*. 2 ed Barueri: Manole, 2004.

Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg* 2005; 3:162–178.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microb Methods* 2008; 72: 157-165.

Penha SS, Birman EG, Silveira FRX, Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. *Pesqui Odontol Bras* 2000; 14:119-122.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 2007;45:321–346.

Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2454-2463.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley JrFL, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 2008; 3(9): 1494-1500.

Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002; 29:1115-1119.

Pusateria CR, Monaco EA, Edgertona M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch Oral Biol* 2009; 54(6): 588–594.

Ramage G, Tomsett K, Wickers BL. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 53-59.

Ramage G, Saville PS, Thomas PD, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 633–638.

Ramage G, Jose A, Coco B, Rajendran R et al. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 111: 456-460.

Reche NSG. Controle da placa dental em deficientes mentais com o uso da clorexidina. Dissertação de mestrado - Universidade de Marília - UNIMAR, 2005.

Robbins N, Uppuluri P, Nett J, Rajendran R, Ramage G, Lopez- Ribot JL, Andes D, Cowen LE. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathogens* 2011; 7 (9): 1-18.

Rocha CGBB, Reis C, Pimenta FC. Contagem e identificação de microrganismos na saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após higienização e bochecho com antissépticos. *Rev Pat Trop* 2006; 35 (2): 125-133.

Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. Development of resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antimicrobiol Chemother* 2005; 46: 291-295.

Sabzghabae AM, Davoodi N, Ebadian B, Aslani A, Ghannadi A. A avaliação clínica do óleo essencial de "*Hortensis Satureia*" para o tratamento de estomatite protética. *Dent Res J* 2012; 9 (2): 198-202.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000 2009; 49: 39–59.

Schauer F, Hanschke R. Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses* 1999; 42: 12- 21.

Schinella G, Aquila S, Dade M, Giner R, Recio Mdel C, Spegazzini E, de Buschiazzo P, Tournier H, Ríos JL. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. *P Med* 2008, 74: 215-220.

Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5:125-57.

Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002; 36: 93-100.

Shchepin R, Hornby JM, Burger E, Niessen T, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chem Biol* 2003; 10: 743– 750.

Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF. Interaction of *Candida albicans* cell-wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed species communities. *Infect Immun* 2010; 78: 4644-4652.

Simoni IC, Tomitao MTP, Kaziyama VM, Padilha MA, Fernandes MJB, Costa SS. Avaliação do efeito de extratos e frações de embaúba (*Cecropia pachystachya*) sobre herpesvírus suíno. *J Bras Fitomed* 2007; 05 (3): 152.

Soll DR. Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Res* 2009; 9: 973-989.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 1999; 283: 1535-1538.

Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed- species cultures with dental and periodontal pathogens. *PLoS ONE* 2010; 5(10): 131-135.

Stepanovic´ S, Vukovic´ D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic´ S, C´irkovic´ I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115:891–899.

Sudberry P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 2004; 12 (7): 317-324.

Sugimura Y, Katodani N, Ueda Y, Shima K, Kitajima S, Furusawa T, Ikegami M. Transgenic patchouli plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2005; 82(3): 251–257.

Thompson GR III, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 488- 495.

Toti-Rodrigues ML. Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*. Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP, 2008.

Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Barnerjee M, Ramasubramanian AK, Kohler JR, Kadosh D, Lopez-Ribot JL. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. PLoS Pathogens 2010; 6 (3).

Vazquez JA. Therapeutic options for the management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in HIV/AIDS patients. HIV Clin Trials 2000; 1: 47–59.

Vitória: Fitoterapia nas Unidades Básicas de Saúde. Rev Bras Saúde da Família 2008; 50-53.

Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus, Wittmer A, Pelz K, Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine 2007;14 (7-8):508-16.

White DJ. An alcohol-free therapeutic mouthrinse with cetylpyridinium chloride (CPC) – The latest advance in preventive care: crest pro-health rinse. Am J Dent 2005; 18(special issue): 3A–8A.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MAO. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontology 2000 2011; 55: 250-265.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microb 2011; 3: 5771.

Williams DW, Potts AJ, Wilson MJ, Matthews JB, Lewis MAO. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. J Oral Pathol Med 1997; 26: 83–89.

Zhao Z, Lu J, Leung K, Chan CL, Jiang ZH. Determination of patchoulic alcohol in *Herba Pogostemonis* by GC-MS-MS. Chem Pharm Bull 2005; 53 (7): 856-860.

Figura 1- http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl

9 ANEXOS

Anexo 1 – Meios de cultura e reagentes utilizados

1) Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol (Difco)

ASD65g

Água destilada q.s.p.....1L

- O meio é pesado de acordo com a determinação do fabricante (para preparo de 1 litro de meio) e levado ao micro-ondas para fundir o ágar;
- Após homogeneização o meio é esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos e distribuído em placas de Petri estéreis. As placas são armazenadas em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

2) CHROMagar Candida

CHROMagar Candida (CHROMagar)47,7g

Água destilada estéril1L

- O ágar é adicionado à água destilada estéril e levado ao micro-ondas até a completa fusão do ágar, evitando a fervura, sendo depois distribuído em placas de Petri estéreis (90X15 mm). As placas são armazenadas em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

3) Meio RPMI -1640 (Sigma-Aldrich)

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio10,4g
Água destilada1L

- O meio é solubilizado em água destilada, sob agitação com barra magnética, sem aquecimento; o pH é ajustado para 7,0 com tampão MOPS (0,165 M);
- A solução é esterilizada por filtração em membrana com poro de 0,22 μ m de diâmetro (Millipore) e conservada em frasco estéril em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

4) YPD

Peptona 20g
Dextrose 20g
Extrato de levedura 10g
Água destilada1L

- Os constituintes são dissolvidos em 1 litro de água destilada sob agitação e com aquecimento. Após ajuste do pH para 6,5 \pm 0,2, o meio é esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos e armazenado em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

5) Tampão PBS 0,2M

- Preparar as soluções A e B
- Solução A: Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2M \rightarrow 2,76 g/100mL de água destilada.
- Solução B: Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2M \rightarrow 5,365 g/ 100 mL de água destilada.

Solução A14mL

Solução B 36mL

NaCl8,5 g

Água destilada q.s.p1L

- Os constituintes são misturados sob agitação e o pH ajustado para 7.2. A solução é esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos e armazenada em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

Anexo 2- Valores de CIM dos isolados clínicos de *Candida albicans* nos testes de microdiluição com extratos.

Teste Microdiluição Extratos (CIM - µg/mL)					
Isolados	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	<i>Arctium lappa</i>	<i>Equisetum</i> sp.	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.	<i>Pogostemon heyneanus</i>
02B	62,50	250	250	7,81	125
03B	125	250	250	3,91	125
05B	250	250	250	3,91	125
06B	62,50	250	250	3,91	125
68B	250	250	250	7,81	125
134B	62,50	250	250	7,81	62,50
78V	62,50	250	250	3,91	62,50
97V	62,50	250	250	3,91	62,50
121V	125	250	250	7,81	125
141V	250	250	250	7,81	125
163	125	250	250	7,81	125
167	125	250	250	3,91	62,50
81H	125	250	250	7,81	125
84H	62,50	250	250	3,91	62,50
85H	62,50	250	250	3,91	62,50

Anexo 3 – Valores de CIM dos isolados clínicos de *Candida albicans* nos testes de microdiluição com antissépticos bucais.

Teste Microdiluição Antissépticos (CIM - %)				
Isolados	Cepacol® Cool Ice	Listerine® Cool Mint	Periogard®	Plax® Whitening
02B	0,20	1,56	0,20	1,56
03B	0,20	6,25	0,20	1,56
05B	0,10	6,25	0,10	1,56
06B	0,20	3,13	0,20	1,56
68B	0,10	6,25	0,10	1,56
134B	0,10	6,25	0,10	0,39
78V	0,10	0,39	0,10	0,39
97V	0,10	3,13	0,10	0,39
121V	0,10	6,25	0,10	1,56
141V	0,10	6,25	0,10	1,56
163	0,10	6,25	0,10	1,56
167	0,10	6,25	0,10	0,78
81H	0,10	3,13	0,10	0,78
84H	0,10	3,13	0,10	0,39
85H	0,20	3,13	0,20	1,56

Anexo 4 – Valores de leitura da D.O. nos testes de formação de biofilme

Isolados de <i>C. albicans</i>	D.O	Local de Isolamento
ATCC 90028	0,102	Cepa Padrão
01B	0,050	Mucosa Oral
02B	0,020	Mucosa Oral
03B	0,112	Mucosa Oral
04B	0,116	Mucosa Oral
05B	0,025	Mucosa Oral
06B	0,020	Mucosa Oral
100B	0,070	Mucosa Oral
104B	0,103	Mucosa Oral
110B	0,000	Mucosa Oral
120B	0,035	Mucosa Oral
122B	0,065	Mucosa Oral
127B	0,069	Mucosa Oral
128B	0,000	Mucosa Oral
134B	0,105	Mucosa Oral
135B	0,000	Mucosa Oral
140B	0,018	Mucosa Oral
142B	0,000	Mucosa Oral
66B	0,001	Mucosa Oral
68B	0,000	Mucosa Oral
71B	0,040	Mucosa Oral
72B	0,039	Mucosa Oral
73B	0,124	Mucosa Oral
80B	0,023	Mucosa Oral
82B	0,298	Mucosa Oral
83B	0,004	Mucosa Oral
121V	0,009	Mucosa Vaginal
141V	0,041	Mucosa Vaginal
67V	0,104	Mucosa Vaginal
76V	0,308	Mucosa Vaginal
78V	0,090	Mucosa Vaginal
97V	0,181	Mucosa Vaginal
163	0,000	Sangue
165	0,069	Sangue
167	0,000	Sangue
175	0,165	Sangue
180	0,059	Sangue
184	0,065	Sangue
186	0,357	Sangue

187	0,074	Sangue
189	0,137	Sangue
190	0,151	Sangue
195	0,070	Sangue
268	0,000	Sangue
269	0,000	Sangue
02C	0,028	Sangue
04C	0,033	Sangue
168A	0,000	Sangue
266C	0,067	Sangue
AP424	0,032	Sangue
T266	0,058	Sangue
T405	0,192	Sangue
107H	0,105	Trato Urinário
115H	0,034	Trato Urinário
121H	0,000	Trato Urinário
66H	0,048	Trato Urinário
78H	0,033	Trato Urinário
81H	0,120	Trato Urinário
84H	0,158	Trato Urinário
85H	0,684	Trato Urinário
89H	0,090	Trato Urinário
90H	0,108	Trato Urinário
93H	0,051	Trato Urinário

Anexo 5 – Resultados dos testes de inibição de formação de biofilme.

Isolados	Concentração (%) (100% de Inibição)			
	Cepacol® Cool Ice	Listerine® Cool Mint	Periogard®	Plax® Whitening
90028	25	12,5	0,39	0,78
03B	0,39	*	*	*
04B	0,20	0,20	0,20	0,20
73B	*	*	*	50
82B	25	12,5	25	25
104B	*	*	*	*
134B	*	*	1,56	*
67V	0,20	0,20	1,56	0,20
76V	0,20	0,39	0,39	0,20
97V	0,20	0,20	0,20	0,20
T405	0,39	0,20	0,20	0,20
175	*	*	1,56	0,78
186	*	*	*	*
189	*	*	*	*
190	0,20	0,20	0,20	0,20
81H	12,5	0,39	0,39	0,78
84H	12,5	3,13	3,13	3,13
85H	*	*	6,25	*
90H	*	*	*	*
107H	0,20	0,20	0,20	0,20

(*) Sem inibição ou inibição menor que 100%

Anexo 6 – Fotos das placas nos testes de suscetibilidade aos extratos

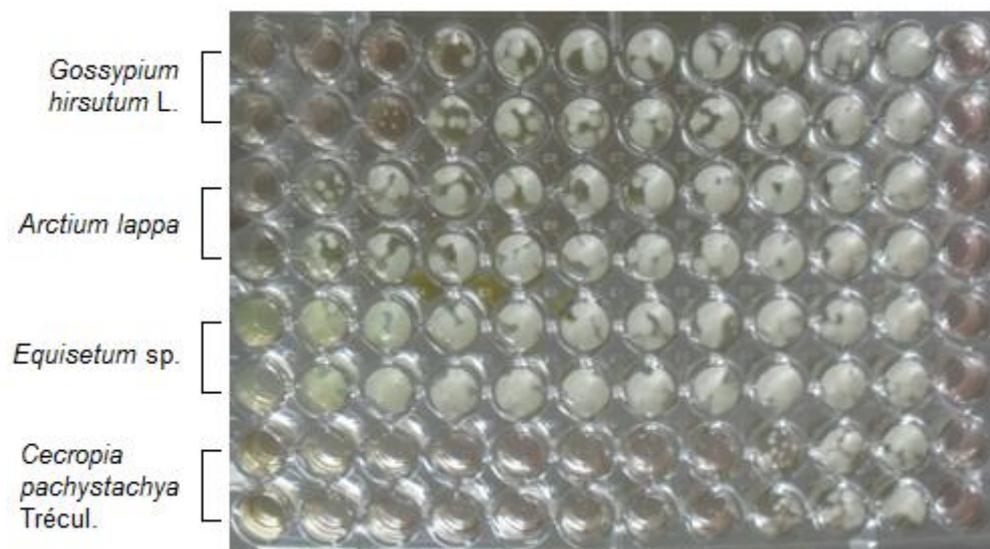


Foto 1 – Extratos

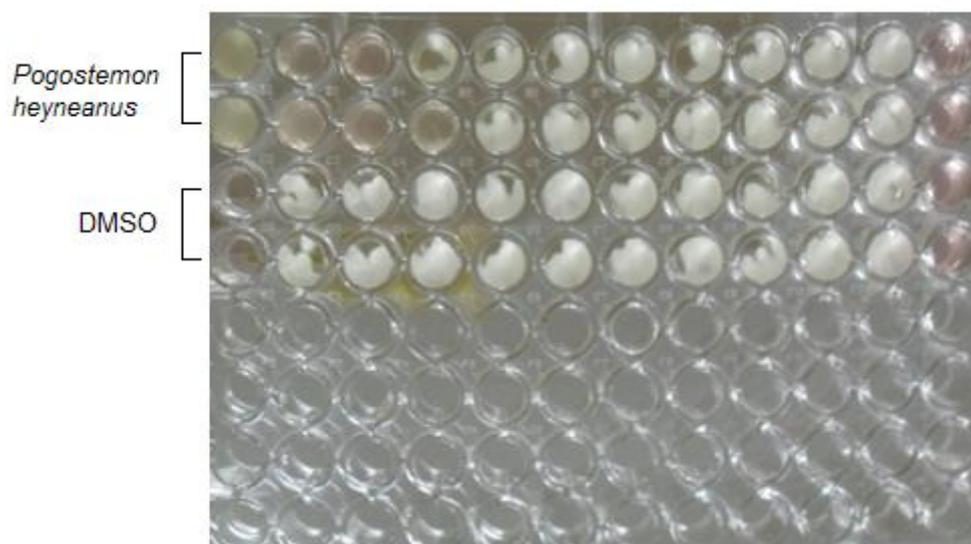


Foto 2 – Extrato e DMSO

Anexo 7 – Fotos das placas nos testes de suscetibilidade a antissépticos bucais

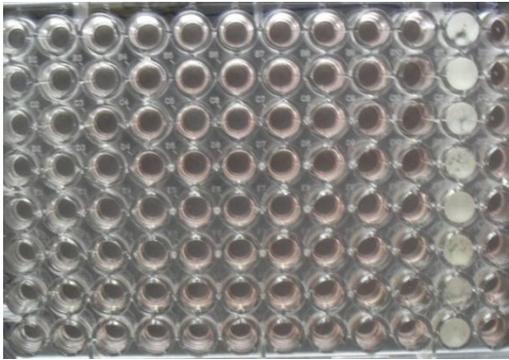


Foto 1 - Cepacol® Cool Ice

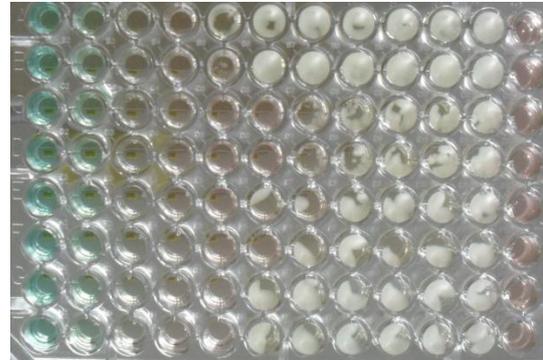


Foto 2 - Listerine® Cool Mint



Foto 3 - Periogard®



Foto 4 – Plax® Whitening

Anexo 8 – Fotos das placas nos testes de biofilme

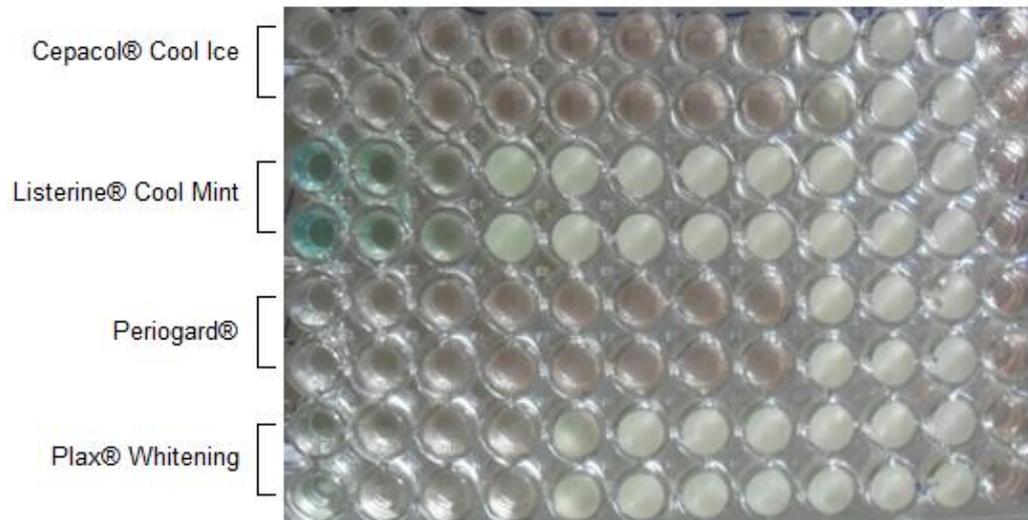


Foto 1 - Inibição da formação de biofilme, após 24 horas de incubação



Foto 2 - Inibição da formação de biofilme, após preparação para leitura da DO