

RITA DE CÁSSIA MARDEGAN
Bióloga

**Atividade Inibitória de Extratos Vegetais
sobre *Candida* spp e sobre Proteinases
sintetizadas por *Candida albicans***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Buço-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling.
Co-orientadora: Prof. Dra. Mary Ann Foglio

PIRACICABA
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

M334a Mardegan, Rita de Cássia.
Atividade inibitória de extratos vegetais sobre *Candida* spp e sobre
proteinasas sintetizadas por *Candida albicans*. / Rita de Cássia Mardegan. --
Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: José Francisco Höfling, Mary Ann Foglio.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Fatores de virulência. 2. *Mentha piperita*, 3. *Casearia sylvestris*, 4.
Tabebuia avellanedae, 5. *Arrabidaea chica*, 6. *Rosmarinus officinalis*; I.
Höfling, José Francisco. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Inhibitor activity from vegetable extracts in *Candida* spp and in
proteinasas synthesize by *Candida albicans*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Virulence factors, 2. *Mentha piperita*, 3.
Casearia sylvestris, 4. *Tabebuia avellanedae*, 5. *Arrabidaea chica*, 6. *Rosmarinus*
officinalis.

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: José Francisco Höfling, Reginaldo Bruno Gonçalves, Alexandre
Nunez Ponezzi, Marta Cristina Teixeira Duarte, Regianne Umeko Kamiya

Data da Defesa: 27-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata RITA DE CÁSSIA MARDEGAN aprovada.

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

PROF. DR. ALEXANDRE NUNES PONEZI

PROFa. DRa. REGIANNE UMEKO KAMIYA

PROFa. DRa. MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE

PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES

Dedicatória

A Deus

Por estar sempre no meu caminho

Obrigada Meu Deus!

Aos meus pais

Dirceu e Sônia, que muitas vezes, deixaram de realizar seus sonhos, para realizar os meus.

Minha eterna gratidão, pelo amor incondicional, pelo carinho, apoio e incentivo.

Muito obrigado Pai!

Muita obrigada Mãe!

Aos meus irmãos

Cintia, Junior, Amanda, companheiros de todos os momentos de luta, sempre solícitos, que

me deram incentivo para continuar a caminhar em busca dos meus ideais.

Muito obrigada!

Ao Eduardo Cavichiole Sucker

Pela dedicação, carinho, compreensão e, acima de tudo, amor e respeito.

Seu amor e seu incentivo fizeram-me confiante.

A você meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Celso Paulino da Costa

Que sempre de alguma maneira esteve presente ao meu lado

Ao Sr. o meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Valter Radamés Accorsi

pelo carinho e atenção que sempre me dedicou

Ao Sr. o meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. José Francisco Hofling, *pela orientação, pelo carinho e atenção*

sempre presentes durante a realização deste trabalho. Ao Sr. o meu muito obrigada!

A Profa. Dra. Mary Ann Foglio *por todas as oportunidades*

que me foram dadas, proporcionando meu crescimento profissional e individual.

A você, o meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, *sempre solícito durante a realização*

desse trabalho. A você, o meu muito obrigada!

A Profa. Dra. Regianne Umeko Kamiya *com você por perto tudo fica mais alegre.*

A você, o meu muito obrigada!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Haiter Neto (Diretor), pelo acolhimento e pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Aos Profs. Reginaldo Bruno Gonçalves, Alexandre Nunez Ponezi, Marta Cristina Teixeira Duarte, Regianne Umeko Kamyra, Paulo Caria, Marcelo Boriollo, Marcelo Napimoga, por aceitarem compor a banca examinadora e avaliar este trabalho de tese.

Aos Profs Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti e Dr. Jacks Jorge Júnior (Coordenação do curso de Pós Graduação) e Prof. Dr. Fausto Bérzin (Coordenador do Programa de Pós Graduação em Biologia Buco Dental da FOP-UNICAMP).

Aos Funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia: Anderson Teixeira, Wilma Ferraz e Flávia Pampolini, pela amizade, colaboração e disposição durante nossa convivência e pelo respeito que sempre me distinguiram.

Aos meus amigos de turma da Pós-Graduação: Regianne Umeko Kamiya, Vivian Furletti, Marlise Inêz Klein, Marcelo Henrique Napimoga, Gustavo Obano, Paula Aníbal, Rafael Nobrega Stipp pela amizade e cumplicidade. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal.

Aos meus amigos do coração: Marli, Núbia, Claudia, Romano, Valmir, Felipe, Ariadyne, Ariane, Dinho, Rodão, Ilza, André, Fú e a todos que de alguma forma estão presentes na minha vida.

Em especial aos amigos Heloísa Maria Ceccotti e Adriano Martins pelo companherismo demonstrado a todo instante, incentivo e amizade sempre presentes em nossa convivência.

Aos amigos Prof. Dr. Edvaldo A. R. Rosa e Rosemeire T. Rosa, obrigado pelos ensinamentos, apoio e amizade sempre dispensados.

A uma pessoa muito especial que acabou de chegar e já é o motivo das minhas maiores alegrias, Luiza Mardegan de Almeida. A você e a toda nossa família, eu dedico os frutos desse trabalho!

A CAPES, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa.

A FAPESP e a FAEP pelo apoio financeiro de auxílio a pesquisa.

AO Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP.

Resumo

O uso de extratos vegetais com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Visto que nos últimos anos, a frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente o objetivo deste estudo foi: 1 – testar a atividade dos extratos (diclorometânico e metanólico) de *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Casearia sylvestris*, *Arctium lappa*, *Arrabidaea chica* e *Tabebuia avellanedae* para determinar o potencial antifúngico em cepas padrão de *Candida* spp (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) e em amostras clínicas de *Candida albicans* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e; 2 - avaliar a capacidade desses extratos em inibirem a atividade das proteinases produzidas por *C. albicans*, um dos mais importantes fatores de virulência dessa espécie. Foram incluídos nos testes para analisar a inibição da atividade proteolítica os inibidores de protease (Amprenavir e Ritonavir) e a Pepstatina A. Nossos resultados demonstraram CIMs variadas em relação a sensibilidade de cada cepa. O extrato metanólico de *Arrabidaea chica* foi o mais efetivo na inibição do crescimento de várias espécies de *Candida*, inclusive em relação aos isolados clínicos de *C. albicans*, seguido dos extratos diclorometânicos de *Arctium lappa* e *Mentha piperita*. Nos testes de inibição das proteinases de *Candida albicans* os que se destacaram foram os extratos diclorometânico de *Arrabidaea chica*, *Casearia sylvestris* e *Mentha piperita*. Desta forma concluímos que o extrato metanólico de *A. chica* e os extratos diclorometânicos de *A. lappa*, *M. piperita* e *C. sylvestris* obtiveram relevante atividade antifúngica *in vitro* contra uma variedade de espécies de *Candida* sendo promissores como agente antifúngico.

Palavras-chave: *Candida* spp; proteinases; Plantas medicinais; *Mentha piperita*; *Arrabidaea chica*; *Arctium lappa*; *Tabebuia avellanedae*; *Casearia sylvestris*; *Rosmarinus officinalis*.

Abstract

The use of plants as medicinal substances is one of the most old medicine practices of the humanity. In the last years, the frequency of systemic yeast infection, mainly the opportunistic, has been increased. The overall aims of the present study were: 1 - to test the extract activity (dichloromethane and methanolic) from *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Casearia sylvestris*, *Arctium lappa*, *Arrabidaea chica* and *Tabebuia avellanedae* to determine the antifungal activity using strains of *Candida spp* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) and in clinical isolates of *C. albicans* by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and 2 - evaluate the capacity of the extracts to inhibit the activity of proteinases produced by *C. albicans*, one of the most important virulence factor of these specie. It has been included as a control to evaluate the inhibition of proteolytic activity Amprenavir e Ritonavir and Pepstatina A. Our results showed a variety of MIC patterns according to the strain sensibility. The methanolic extract of *Arrabidaea chica* was the most effective in inhibiting the growth of a variety of *Candida* species, including the clinical isolates of *C. albicans*, followed by dichloromethane extract of *Arctium lappa* and *Mentha piperita*. In relation of the proteinases inhibitory tests from *C. albicans* the most effective extracts tested were dichloromethane of *Arrabidaea chica*, *Casearia sylvestris* and *Mentha piperita*. In conclusion the methanolic extract from *A. chica* and dichloromethane extracts from *A. lappa*, *M. piperita* e *C. sylvestris* have relevant antifungal activity against a range of *Candida* specie in vitro and are promising antifungal agents.

Key words: *Candida spp*; proteinases; Medicinal plants; *Casearia sylvestris*; *Mentha piperita*; *Arctium lappa*; *Arrabidaea chica*; *Tabebuia avellanedae*; *Rosmarinus officinalis*.

Lista de Abreviaturas e Siglas

$\mu\text{g/mL}$	-	Microgramas por mililitro
μM	-	micromolar
BSA	-	Albumina do Soro Bovino
<i>C. albicans</i>	-	<i>Candida albicans</i>
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CH_2Cl_2	-	Diclorometano
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CPMA	-	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	-	Dimetil Sulfoxido
<i>et al.</i>	-	E outros (abreviatura de “ <i>et al.</i> ”)
g	-	Gramas
IB	-	Instituto de Biologia
<i>In vitro</i>	-	conjunto de reações que se realizam em condições laboratoriais
<i>In vivo</i>	-	Experimento realizado em seres vivos
MeOH	-	Metanol
Mg/mL	-	Microgramas por mililitro
mL	-	Mililitro

mm	-	Milímetro
NaCl	-	Cloreto sódio
NCCLS	-	National Committee for Clinical Laboratories Standards
°C	-	grau Celsius
PFD	-	Planta Fresca extração com Diclorometano
PFM		Planta Fresca extração com Metanol
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PZ	-	Zona de precipitação
rpm	-	Rotação por minuto
UEC	-	Universidade Estadual de Campinas
UFC	-	Unidade formadora de colônias
YPD	-	Yest peptone dextrose

Lista de Figuras

- Figura 1 - Plantas selecionadas para o estudo, utilizadas para avaliar a atividade antifúngica: A) *Arctium lappa* (Bardana); B) *Mentha piperita* (Hortelã); C) *Rosmarinus officinalis* (Alecrim); D) *Arrabidaea chica* (Pariri); E) *Tabebuia avellanedae*; F) *Casearia Sylvestris*. 25
- Figura 2 - Biomonitoramento do processo extrativo por CCD 28
- Figura 3 - Cepas de *Candida albicans* cultivadas em ágar proteinase. Cultivo de 4 cepas de *Candida albicans* em Ágar proteinase. Após o período de incubação, zonas de degradação podem ser observadas ao redor das colônias de leveduras. 37
- Figura 4 - Cálculo da atividade enzimática. Cálculo utilizado para medir a atividade enzimática de colônias de *Candida albicans*, descrito por PRICE *et al.*, 1982. ZP – Zona de Precipitação; DC – Diâmetro da Colônia. 38
- Figuras 6 - Frequência de cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de crianças saudáveis com atividade enzimática para proteinase positiva (incluindo índices 1 e 2) e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa, índice 0. 39
- Figuras 6 - Frequência de cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de adultos com doença periodontal com atividade enzimática para proteinase positiva (incluindo índices 1 e 2) e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa, índice 0. 39

Figura 7	- Os valores de CIMs estão em µg/mL; C.a: <i>Candida albicans</i> ; C.t: <i>Candida tropicalis</i> ; C.p: <i>Candida parapsilosis</i> ; C.d: <i>Candida dubliniensis</i> ; C.k: <i>Candida krusei</i> . – R.o: <i>Rosmarinus officinalis</i> ; T.a: <i>Tabebuia avellanedae</i> ; C.s: <i>Casearia sylvestris</i> ; A.l: <i>Arctium lappa</i> ; M.p: <i>Mentha piperita</i> ; A.c: <i>Arrabidaea chica</i> .	42
Figura 8	- Os valores de CIMs estão em µg/mL; C.a: <i>Candida albicans</i> ; C.t: <i>Candida tropicalis</i> ; C.p: <i>Candida parapsilosis</i> ; C.d: <i>Candida dubliniensis</i> ; C.k: <i>Candida krusei</i> . – R.o: <i>Rosmarinus officinalis</i> ; T.a: <i>Tabebuia avellanedae</i> ; C.s: <i>Casearia sylvestris</i> ; A.l: <i>Arctium lappa</i> ; M.p: <i>Mentha piperita</i> ; A.c: <i>Arrabidaea chica</i> .	43
Figura 9	- Amostras clínicas de crianças (n=50) e adultos (n=50) e CIMs do Fluconazol. S - Sensível; SDS – Susceptibilidade dose dependente; R – resistente.	49
Figura 10	- Amostras clínicas de crianças (n=50) e adultos (n=50) e CIMs em relação a Anfotericina B. S - Sensível; R – resistente.	50
Figura 11	- Inibição das proteinases de <i>C. albicans</i> (%) pelos extratos diclorometânico e metanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	50
Figura 12	- Inibição das proteinases de <i>C. albicans</i> (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de <i>Mentha piperita</i> .	51
Figura 13	- Inibição das proteinases de <i>C. albicans</i> (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de <i>Tabebuia avellanedae</i> .	52
Figura 14	- Inibição das proteinases de <i>C. albicans</i> (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de <i>Arrabidaea chica</i> .	53
Figura 15	- Inibição das proteinases de <i>C. albicans</i> (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de <i>Casearia sylvestris</i> .	53
Figura 16	- Inibição das proteinases de <i>C. albicans</i> (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de <i>Arctium lappa</i> .	54

- Figura 17 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* dos obtidas apartir de amostras clínicas de crianças pelos extratos (diclorometânico e metanólico) de todas as plantas analisadas. 55
- Figura 18 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* dos obtidas apartir de amostras clínicas de adultos pelos extratos (diclorometanico e metanólico) de todas as plantas analisadas. 56
- Figura 19 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* dos obtidas apartir de amostras clínicas de adultos pelos extratos (diclorometanico e metanólico) de todas as plantas analisadas. DC - Extrato diclorometanico; MT - Extrato metanólico. 56
- Figura 20 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* provenientes de amostras clínicas de crianças e adultos e da cepa padrão CBS 562 obtidas com os inibidores de proteases (IPs) Amprenavir, Ritonavir e Pepstatina A. As concentrações em mg / mL. 58

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Plantas selecionadas, parte utilizada e número excicata	26
Tabela 2 -	Concentrações dos extratos vegetais	29
Tabela 3 -	Crítérios de susceptibilidade a Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol e Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$). Valores de referência do NCCLS	31
Tabela 4 -	Cepas padrão de <i>Candida spp</i>	31
Tabela 5 -	Amostras clínicas de crianças e adultos	32
Tabela 6 -	Medidas da atividade enzimática	33
Tabela 7 -	Valores de inibição para testes com material vegetal	34
Tabela 8 -	Perfil da atividade enzimática da proteinase produzida por <i>C. albicans</i> , isoladas de crianças saudáveis e adultos com doença periodontal	39
Tabela 9 -	Cepas padrão e CIMs dos extratos (diclorometanicos e metanólicos)	41
Tabela 10 -	Amostras clínicas de <i>C. albicans</i> e respectivos valores de CIM (%) nos testes realizados com extratos diclorometanico e metanólico de <i>R. officinalis</i>	44

Tabela 11 -	Amostras clínicas de <i>C. albicans</i> e respectivos valores de CIM (%) nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de <i>M. piperita</i> .	45
Tabela 12 -	Amostras clínicas de <i>C. albicans</i> e respectivos valores de CIM (%) nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de <i>Tabebuia avellaneda</i>	45
Tabela 13 -	Amostras clínicas de <i>C. albicans</i> e respectivos valores de CIM (%) nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de <i>C. sylvestris</i>	47
Tabela 14 -	Amostras clínicas de <i>C. albicans</i> e respectivos valores de CIM em % nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de <i>A. lappa</i>	47
Tabela 15 -	Amostras clínicas de <i>C. albicans</i> e respectivos valores de CIM em % nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de <i>A. chica</i>	48
Tabela 16 -	Droga controle (Pepstatina A – inibidor de protease) testada em diferentes concentrações nas amostras clínicas de <i>C. albicans</i>	57

Sumário

1 Introdução	1
2 Revisão da Literatura	3
2.1 Plantas Medicinais	3
2.2 Plantas Medicinais com Atividade Anti-Candida	7
3 Proposição	23
4 Material e Métodos	25
4.1 Plantas	25
4.2 Preparação dos Extratos	26
4.3 Biomonitoramento do Processo Extrativo por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	27
4.4 Limpeza do Extrato	28
4.5 Diluição dos Extratos Vegetais	29
4.6 Preparo e Diluição dos Antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol	30
4.7 Cepas de Microrganismos	31
4.8 Teste da Proteinase	32

4.9 Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos	33
4.10 Teste Detectar Inibição da Atividade Proteolítica das Proteinases de <i>Candida Albicans</i>	34
5 Resultados	37
5.1 Seleção de Cepas de <i>Candida Albicans</i> com Elevada Atividade Proteolítica	37
5.2 Testes para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
6 <i>Discussão</i>	59
7 Conclusão	75
<i>Referências</i>	77
<i>Anexo</i>	93

1 Introdução

A cavidade oral humana tem sido considerada um meio ambiente único, por oferecer uma variedade de nichos ecológicos para colonização microbiana. Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* spp habitam diferentes superfícies epiteliais do corpo, incluindo a mucosa oral, fazendo parte da microbiota residente (McCullough *et al.*, 1996). Além de *Candida albicans*, outras espécies têm sido isoladas, como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*. Em condições normais, o hospedeiro mantém esses microrganismos como comensais, entretanto, alterações locais ou sistêmicas favorecem o desenvolvimento de fatores de virulência, causando danos para o homem, particularmente infecções oportunistas como a candidíase (Aly *et al.*, 1975).

Dentre as espécies de *Candida*, a reconhecida como mais patogênica é *Candida albicans*, assim como outras espécies desse gênero, elas secretam enzimas proteolíticas que podem degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo a uma disfunção e /ou destruição física. O papel das enzimas proteolíticas pode ser unicamente digerir proteínas do hospedeiro promovendo uma fonte de nitrogênio para a célula e contribuindo para adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (Hube & Naglik, 2001).

Nos últimos anos, a frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas, tem crescido drasticamente, dentre elas a candidíase. Paralelamente ao aumento dessas infecções vem ocorrendo à introdução no mercado de novos agentes antifúngicos, assim como o isolamento de cepas resistentes a essas drogas (Colombo *et al.*, 1995).

Apesar da produção de novos antibióticos ter aumentado nas últimas décadas, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. O

tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem relevante toxicidade. O problema da aquisição de resistência às drogas convencionais pelos microrganismos é crescente e as perspectivas futuras da produção e uso de novas drogas ainda continua incerta. Desta forma, o uso de extratos vegetais, de conhecida atividade antimicrobiana, podem ser significativos nos tratamentos terapêuticos (Loguercio *et al.*, 2005). Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, sobretudo, mais ou igualmente seguros quanto à toxicidade em relação aos já existentes.

Visto que as proteinases são fatores de virulência relevantes em alguns tipos de infecção produzidas por *C. albicans*, a utilização de inibidores de proteinases pode ser uma alternativa em novas terapias. Visando contribuir na busca de novos agentes antifúngicos para uma terapia alternativa ou futuramente para a elaboração de novos fármacos, a presente tese foi realizada com o intuito de testar possíveis extratos vegetais com atividade inibitória sobre *Candida* spp (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) e sobre proteinases sintetizadas por *Candida albicans*. As plantas selecionadas para este estudo foram *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Casearia sylvestris*, *Arctium lappa*, *Arrabidaea chica* e *Tabebuia avellanedae* as quais foram testadas em cepas padrão e em cepas clínicas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis e de adultos com doença periodontal.

2 Revisão da Literatura

2.1 Plantas Medicinais

O conhecimento empírico sobre plantas com propriedades medicinais foi acumulado durante séculos sempre acompanhando a evolução do homem através dos tempos. As civilizações primitivas buscavam na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência. O uso das plantas como alimento sempre existiu e, a este, se incorporou a busca de matéria prima para confecção de roupas, ferramentas, combustíveis e medicamentos. A descoberta das propriedades “curativas das plantas” foi no início meramente intuitiva ou dada pela observação dos animais que buscavam nas ervas, a cura para suas afecções (Ferro *et al.*, 2006).

As plantas estão a milhares de anos presente no planeta Terra, num processo antiqüíssimo de adaptação ao meio, elaborando rotas biossintéticas e estratégias químicas que permitem a produção de diversas substâncias de reserva indispensáveis a sua sobrevivência. Essas substâncias de reserva ou, produtos do metabolismo fotossintético das plantas, além de indispensável para a sobrevivência do vegetal podem ainda ser considerada a principal fonte de alimento para os seres vivos (Ferro *et al.*, 2006). Existem ainda alguns “produtos naturais” produzidos pelos vegetais que demonstram ser importantes no processo de interação planta/ambiente atuando como defesa química contra o ataque de bactérias, fungos, protozoários, insetos, pássaros e outros predadores, garantindo a sobrevivência da espécie no ecossistema. Esses “produtos naturais” têm distribuição relativamente restrita a alguns grupos taxonômicos não sendo considerados essenciais ao metabolismo basal da célula vegetal, de onde surge sua denominação “metabólitos secundários” (Verpoorte, 2006). A produção de

metabólitos secundários é resultado da especialização celular do organismo produtor e se deve a expressão diferencial de genes em resposta a alguns fatores químicos ou biológicos (Gottlieb *et al.*, 1996), importantes na regulação de um sistema imunológico rudimentar (Fox, 1980).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 60% da população mundial utilizam medicamentos provenientes de plantas medicinais (OMS, 2002). A importância de se estudar o conhecimento e o uso tradicional das plantas medicinais podem ter três implicações distintas: 1) Resgatar o patrimônio cultural tradicional, assegurando a sobrevivência e perpetuação do mesmo; 2) Aperfeiçoar o desenvolvimento de preparados terapêuticos (medicamentos caseiros) de baixo custo; 3) Organizar os conhecimentos tradicionais de maneira a utilizá-lo em processos de desenvolvimento tecnológico (Amoroso, 1996; Elizabetsky, 1999). O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, e é bem provável que, de cerca de 200.000 espécies vegetais que possam existir no nosso país, pelo menos a metade tem alguma propriedade terapêutica útil para a população; porém nem 1% dessas espécies com potencial medicinal foram empregadas em estudos farmacológicos e toxicológicos. Enquadradas nesta problemática, equipes ligadas a grandes indústrias de medicamentos e cosméticos demonstram um esforço sistemático de recolha e estudo de espécies usadas em medicina popular, em estudos etnobotânicos por várias regiões do mundo, antes que os conhecimentos empíricos tão importantes desapareçam (Ferro, *et al.*, 2006).

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são insipientes, atualmente, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Comparada com a toxicidade dos medicamentos utilizados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como a

ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (Ferro *et al.*, 2006). Ao longo dos anos, o uso milenar de plantas medicinais mostrou que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos (Maciel *et al.*, 2002). O intenso apelo comercial advindo do forte movimento cultural dos naturalistas aumentou em todo mundo, o consumo de plantas medicinais. Entretanto, o uso ilimitado de plantas e fitoterápicos na terapia medicamentosa sem informações seguras sobre seus efeitos tóxicos e colaterais, representam cada vez mais um risco para a saúde humana. A associação de estudos fitoquímicos e farmacológicos torna-se cada vez mais importante para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (Maciel *et al.*, 2002).

Devido a estes aspectos, vê-se um interesse crescente nas pesquisas de plantas medicinais, objetivando fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado, com prévia definição do seu potencial tóxico (Heinrich, 2000; Maciel *et al.*, 2002; Niero *et al.*, 2002).

A OMS define planta medicinal como "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (OMS, 1998). A diferença entre o extrato vegetal da planta medicinal e o fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é "todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação, podem ser utilizados

adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas". Neste último caso encontra-se o fitofármaco, que por definição "é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal" (SVS/MS, 1995). É definido ainda como "preparado fitoterápico intermediário" o produto vegetal (triturado, extrato, tintura, óleo fixo ou volátil, cera, suco) obtido de plantas frescas ou de drogas vegetais (através de operações - extração, fracionamento, purificação) e utilizado no preparo de produtos fitoterápicos (SVS/MS, 1995). Quando é referido o termo "princípio ativo" de um vegetal entende-se como uma substância ou grupo delas, quimicamente caracterizadas, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do produto fitoterápico (SVS/1995).

No caso da comercialização popular de plantas medicinais, muitos cuidados (válidos até mesmo para plantas de uso milenar) são relevantes, tais como identificação errônea da planta (pelo comerciante e pelo fornecedor), possibilidades de adulteração (em extratos, cápsulas com o pó da espécie vegetal, pó da planta comercializado em saquinhos e garrafas), interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos (que possam estar sendo ingeridos pelo usuário da planta), efeitos de superdosagens, reações alérgicas ou tóxicas (Veiga *et al.*, 2005). Desta forma, estudos multidisciplinares envolvendo etnobotânicos, químicos, farmacólogos e agrônomos (neste caso, no controle do cultivo de ervas medicinais) são necessários para que sejam ampliados os conhecimentos das plantas medicinais, como agem, quais são os seus efeitos tóxicos e colaterais, como seriam suas interações com novos medicamentos alopáticos e quais as estratégias mais adequadas para o controle de qualidade e produção de fitoterápicos, atendendo às novas normas das agências reguladoras, como as resoluções da ANVISA (Veiga *et al.*, 2005).

2.2 Plantas Medicinais com Atividade Anti-Candida

A ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando um aumento expressivo, nos últimos anos. Vários fatores estão relacionados com o crescimento dessas infecções, dentre eles: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o emprego de medicamentos imunossupressores, utilizados às vezes de forma abusiva, permitindo a instalação de microorganismos convencionalmente saprófitos (Sidrim *et al.*, 1998). Apesar da produção de novos antibióticos ter aumentado nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. O tratamento das micoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência, além de apresentarem importante toxicidade. Além disso, os microorganismos possuem habilidades genéticas de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema da aquisição de resistência às drogas convencionais pelos microorganismos é crescente e as perspectivas futuras da produção e uso de novas drogas ainda continua incerta. Desta forma, o uso de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana podem ser significativos nos tratamentos terapêuticos (Loguercio *et al.*, 2005). Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, sobretudo, mais ou igualmente seguros quanto à toxicidade em relação aos já existentes. A literatura etnobotânica, relata uma lista de plantas utilizadas na medicina popular brasileira no tratamento de sinais e sintomas relacionados com infecções fúngicas, dentre elas algumas famílias e espécies se destacam:

A família *Flacourtiaceae* possui cerca de 800-1000 espécies distribuídas em 80-95 gêneros ocorrentes na América, África, Ásia, Malásia, Austrália e nas ilhas do Pacífico. Encontra-se distribuída tanto em campos rupestres e matas ciliares como na caatinga e cerrados. Pertencente a essa família, a Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw) cresce como um arbusto ou árvore de pequeno porte, geralmente com 2 ou 3 metros de altura, mas que às vezes pode atingir até 10 metros em

áreas isoladas da Amazônia. No Brasil, ocorre em quase todas as regiões e formações florestais. Essa grande distribuição pelo continente atesta, entre outras coisas, uma grande capacidade adaptativa em diversas condições geográficas (Almeida *et al.*, 1998). *C. sylvestris* possui propriedades medicinais que são conhecidas há tempo pelo uso popular, algumas das quais cientificamente comprovadas. Além de ser conhecida como guaçatonga, outros nomes populares ainda lhe são atribuídos: café-bravo, café silvestre, erva-de-bugre, pau de lagarto dentre outros (Lorenzi & Abreu Matos, 2000). Os indígenas da floresta Amazônica têm utilizado a guaçatonga como remédio antiofídico. Uma decocção da folha é preparada tanto para aplicação tópica como para ser ingerida. Isso vem sendo validado por cientistas, nos últimos anos, que documentaram a capacidade do extrato obtido das folhas de *C. sylvestris* de neutralizar vários tipos de veneno de cobras (Borges *et al.*, 2001) e abelhas (Borges *et al.*, 2000).

A composição química da guaçatonga é complexa. As folhas e galhos dessa planta contem um composto fitoquímico conhecido como lapachol (Borges *et al.*, 2000; Oberlies *et al.*, 2002;) que apresenta atividades anticancerígena e antifúngica. Este composto pode ser encontrado em outras plantas da floresta tropical conhecida como pau d'arco (*Tabebuia* spp). Um novo composto tem despertado interesse na guaçatonga, os chamados diterpenos clerodano (Carvalho *et al.*, 1998). Os diterpenos clerodano têm sido testados em relação a uma variedade de atividades biológicas desde agente anti-infeccioso contra picada de insetos até como agentes antitumorais, antimicrobianos e até como inibidores da replicação do vírus HIV. Alguns dos diterpenos clerodano documentados na guaçatonga são compostos químicos novos denominados casearinas (de A até S) (Itokawa *et al.*, 1988, 1989, 1990). Mais tarde um outro grupo de pesquisa, descobriu novas casearinas nas folhas e galhos da guaçatonga nomeadas de casearvestrina A, B e C, afirmando que: "Todos os três componentes demonstrados prometem bioatividade tanto na avaliação de citotoxicidade em relação a vários tipos de células tumorais quanto em relação a atividade

antifúngica (Oberlies *et al.*, 2002). Extratos obtidos dessa espécie demonstram ainda atividade contra bactérias resistentes do tipo *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, porém inatividade contra outras bactérias comuns como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli* (Almeida Alves *et al.*, 2001). Atividade antifúngica, inclusive em relação a *C. albicans* (Arantes *et al.*, 2004). Pronunciada atividade contra *Trypanossoma cruzi* (Espindola *et al.*, 2004), larvas de *Aedes aegypti* (Rodrigues *et al.*, 2006) e atividade antiplasmodial, inclusive contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária (Mesquita *et al.*, 2007) também já foram relatadas. Segundo dados da literatura não se conhece nenhuma contra indicação em relação ao seu uso e nenhuma interação medicamentosa (Lorenzi & Abreu Matos, 2000).

A família botânica *Lamiaceae*, também denominada *Labiatae*, amplamente citada devido suas propriedades medicinais, incluem cerca de 236 a 258 gêneros e 6790 a 7193 espécies, subdivididas em sete subfamílias, a maioria se apresenta na forma de arbustos e ervas e raramente na forma de árvores (Ilori *et al.*, 1996). Há cerca de 23 gêneros e 232 espécies nativas no Brasil. São cosmopolitas, porém têm centro de origem as regiões mediterrâneas e do Oriente Médio. A essa família inúmeras propriedades são atribuídas tais como: atividade antioxidante (Gulluce, 2003; Mimika-Dukic *et al.*, 2003, 2004), antimicrobiana (Shokeen, 2005; Djilas *et al.*, 2006), antifúngica (Ricci, 2005; Soyulu, 2006), inclusive anticandida (Gulluce 2003; Karioti, 2006).

O Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L) pertencente a família botânica *Lamiaceae*, é um arbusto comum na região do Mediterrâneo. Devido ao seu aroma característico, os romanos designavam-no como *rosmarinus*, que em latim significa o orvalho que vem do mar. Apresenta-se como um arbusto muito ramificado, sempre verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas e finas, opostas, e lanceoladas. Utilizada com fins culinários, medicinais, religiosos, a sua essência também é utilizada em perfumaria, pois contém tanino, óleo essencial, pinere,

cânfora e outros princípios ativos que lhe conferem propriedades excitantes, tônicas e estimulantes (Lorenzi & Matos, 2000).

A classificação botânica do Alecrim é um tanto quanto complexa, podendo encontrar espécies do gênero *Rosmarinus* com amplas variações e formas (Ghenther, 1985). Relatam-se variações significantes na composição química dessa planta em relação à origem geográfica (Rao *et al.*, 1997; Dellacassa *et al.*, 1999; Atti-Santos *et al.*, 2005).

O alecrim, uma planta que vem sendo estudada há bastante tempo se trata de uma erva de grande valor medicinal, amplamente utilizada na formulação de produtos farmacêuticos e na medicina popular como digestivo, tônico, adstringente, diurético, é utilizado no tratamento de afecções urinárias (Leung & Foster, 1996; Haloui *et al.*, 2000), distúrbios gastro-intestinais (Matos, 1994) além de apresentar atividade anti-úlceras (Corrêa-Dias, *et al.*, 2000). Estudos realizados com alguns extratos, óleos essenciais e alguns constituintes químicos isolados desta espécie demonstraram um grande número de atividades biológicas interessantes como: antiviral (Paris *et al.*, 1993), antiinflamatória (Aruoma *et al.*, 1996), antimicrobiano (Gruenwald *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2003; Oluwatuyi *et al.*, 2004) e antifúngica (Larrondo *et al.*, 1995), incluindo atividade contra *Candida* spp (Boorhem *et al.*, 1999; Gruenwald *et al.*, 2000). Um grande número de componentes polifenólicos com atividade antioxidante vem sendo identificados no alecrim: como diterpeno fenólico e ácido cafêico (Cuvelier *et al.*, 2000) que lhe conferem atividade antioxidante (Inatani *et al.*, 1983; Dorman *et al.*, 2003). Outros trabalhos de pesquisa realizados, visando analisar os constituintes químicos dessa espécie, demonstraram vários tipos de diterpenos, incluindo um diterpeno quinona (Inatani *et al.*, 1983; Takenaka *et al.*, 1997), diterpenos fenólicos como carnosol, rosmanol, 7-methyl-epi-rosmanol, isorosmanol, ácido carnosico, metyl-carnosato e outros ácidos fenólicos como rosmarinico e cafêico. Estes componentes estão descritos na literatura e já foram isolados e identificados por alguns autores (Inatani *et al.*, 1983; Angione *et al.*, 2004), além de alguns triterpenóides (Gavena

et al., 1993) e flavonóides (Okamura *et al.*, 1994). Além disso, compostos extraídos do alecrim não apresentaram toxicidade, em doses controladas, quando testados em modelos animais (Lemonica *et al.*, 1996). Pertencente a mesma família botânica *Lamiaceae*, *Mentha* spp são em sua maioria originárias da América do Norte, Austrália e Ásia. As mentas são plantas herbáceas compreendendo numerosas espécies (1008 espécies catalogadas) das quais muitas são cultivadas visando suas propriedades aromáticas e condimentares, ornamentais ou medicinais (Lorenzi & Matos, 2002). A espécie *Mentha piperita* (popularmente conhecida como hortelã, menta, hortelã-pimenta, dentre outros, dependendo da região em questão, é nativa da Europa, porém cultivada em muitas partes do mundo. É uma espécie híbrida de *Mentha espicata* L e *Mentha aquática* L e cresce particularmente bem em solo fartamente irrigado. Pelo fato se exalar uma fragrância e ter um sabor característico, as folhas de hortelã, frescas ou desidratadas e o óleo essencial obtido dessa planta são utilizados em grande escala na culinária e em produtos (McKay & Blunberg, 2006).

Mentha piperita L é uma das ervas medicinais mais utilizadas pela população. A lista de usos e de benefícios da hortelã na medicina popular como remédio ou como tratamento alternativo (terapias medicamentosas alternativas) inclui: desordens biliares, dispepsia, enterites, flatulências, gastrites, cólicas intestinais e espasmos do trato gastrintestinal (McKay & Blunberg, 2006). Os componentes químicos das folhas de hortelã e de seu óleo essencial variam conforme a maturidade da planta, variedade, a região geográfica, e as condições de processamento (Maffei & Scannerini, 1992; Blanco *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). A composição do ácido graxo, a fração lipídica não polar das folhas de hortelã tem como componentes predominantes os ácidos palmítico (16:0); linoleico (18:2) e linolenico (18:3) (Maffei & Scannerini, 1992). Os componentes mais voláteis determinados no óleo essencial de hortelã são mentol (33-60%), mentona (15-32%), isomentona (2-8%), 1,8 cineol (eucalyptol (5-13%) metil acetato (2-11%) mentofurano (1-10%), limonenico (1-10%) β -mirceno (0,1-1,7%); β -cariopileno (2-

4%), pulegone (05-1,6%) e carvone (1%) (Pittler & Ernst, 1998; Gherman *et al.*, 2000). A análise fitoquímica das folhas registra como principal componente o óleo essencial, rico na mistura de mentol, mentona, e mentofurano, além de terpenos, aldeídos, taninos, e flavonóides (Corrêa *et al.*, 2002).

Matos (1998) descreve essa espécie como produtora de óleo essencial rico em mentol, mentona e mentofurano, sendo estes compostos mais abundantes nas folhas. O mentol destaca-se como matéria prima importante na indústria de tabaco e de produtos destinados à higiene bucal e confeito. Estudos realizados por Iscan *et al.*, 2002 observaram que o mentol parece ser o principal constituinte responsável pela sua bioatividade. *Mentha piperita* possui capacidade antioxidante segundo alguns grupos de pesquisa. Essa capacidade já foi determinada através de diferentes tipos de ensaios (Dragland *et al.*, 2003, Mímica-Dukic *et al.*, 2003). Apresenta ainda atividade antitumoral (Ohara & Matsuhisa, 2002), antiinflamatória e antialérgica (Inoune *et al.*, 2002; Satsu *et al.*, 2004) antiviral (Herrmann & Kucera 1967; Manolova *et al.*, 1995) inclusive contra vírus da Imunodeficiência humana do tipo HIV-1 (Yamasaki *et al.*, 1998) e o vírus da herpes simples HSV-1 e HSV-2 (Schuhmacher *et al.*, 2003). Vários estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de óleos e extratos de *Mentha piperita*. (Piccaglia *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1996; Akim *et al.*, 2001; Iscan *et al.*, 2002), atividade antifúngica (Vaughn *et al.*, 1994; Baruah *et al.*, 1996; Gianperi *et al.*, 2002; Mímica-Dukic *et al.*, 2003), incluindo atividade contra *Candida* spp (Pattnaik *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 2005).

Outra família botânica bastante estudada devido as suas propriedades medicinais é a Família *Bignoniaceae* que contém cerca de 120 gêneros e 800 espécies distribuídas pelas regiões tropicais da América do Sul e da África. São plantas lenhosas, predominantemente lianas, mas também podem ser arbustivas e arbóreas. No Brasil diversas espécies de *Bignoneaceae* têm uso medicinal e algumas atividades biológicas já foram comprovadas cientificamente.

Tabebuia avellanedae, uma árvore pertencente à família *Bignoniaceae*, é popularmente conhecida como ipê-roxo ou pau d'arco. Sua entrecasca é utilizada na medicina popular como analgésica, antiinflamatória, antineoplásica, diurética, antiinfecioso, antifúngico, adstringente, no tratamento caseiro do impetigo, psoríase e alergias (Sousa *et al.*, 1991; Taylor, 1998). Essa planta é rica em naftoquinona (Wagner, *et al.*, 1989), que possui atividade antibacteriana (D'Albuquerque, 1968), antifúngica (Gershon, 1975), antiviral (Lagrotta, *et al.*, 1986) e antineoplásica (Schuerch, 1978) Suas atividades antiinflamatória, antineoplásica e diurética são citadas na literatura como sendo devido à saponinas, flavonóides, cumarinas e antibióticos naturais como o lapachol e seus derivados (Panizza, 1997; Falkenberg, 1999). O extrato aquoso da entrecasca de *Tabebuia avellanedae* não demonstrou sinais de toxicidade quando testadas em camundongos (Daval *et al.*, 1991; Sawynok & Yaksh, 1993).

Também pertencente a família *Bignoneaceae*, *Arrebidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, popularmente conhecida como pariri, crajiru, puga-panga, coapiranga, chica, cipó-cruz dentre outros, é nativa de quase todo o Brasil, e muito comum na região Amazônica onde é amplamente utilizada na medicina caseira. É considerada antiinflamatória (Zorn *et al.*, 2001) e antimicrobiana (Taylor, 1998). Das folhas frescas se obtém um corante utilizado pelos indígenas da Amazônia para limpeza de feridas crônicas e para o tratamento de doenças da pele como micoses e herpes (Taylor, 1998; Mors *et al.*, 2000). O chá de suas folhas é utilizado na medicina tradicional como adstringente e empregado para espasmos intestinais, diarreia, leucemia, lavagem de feridas, anemia e enterocolite (Vieira & Albuquerque, 1998; Mors *et al.*, 2000). Há ainda relatos de grande efeito contra câncer de boca, útero, leucemia e como antiinflamatório (Kalil Filho, 2000).

Pela fermentação de suas folhas se obtém um corante que se precipita como um sólido vermelho contendo dois flavonóides de estrutura quinônica denominada de "carajurina" e "carajurona" (Chapman *et al.*, 1927). Também são encontrados na composição dessa planta os compostos ativo ácido anísico,

taninos, ferro assimiláveis e cianocobalamina (Vieira & Albuquerque, 1998). Uma revisão bibliográfica indicou que este gênero é fonte de antocianinas, flavonóides e taninos (Zorn, *et al.*, 2001; Alcerito, 2002; Devia *et al.*, 2002; Pauletti *et al.*, 2003) e recentemente foram descobertas novas glicosilxantonas isoladas do caule de *Arrabidaea samydoides* que apresentaram propriedades antioxidantes (Pauletti *et al.*, 2003). Alcerito *et al.* (2002) também isolaram quatro flavonóides com atividade antifúngica das folhas de *A. brachypoda*. Sua composição química mostra saponinas, quininos, flavonas, taninos, pigmentos flavônicos e indícios de alcalóides (Kalil Filho, 2000). Ainda encontram-se relatos de Williams & Grayer (2004) e Takemura (1995) que descreveram a caracterização de antocianinas na espécie vegetal. Os constituintes químicos das folhas, que contêm um pigmento vermelho, foram estudados desde Chapman *et al.* (1927) que identificaram a substância 3-deoxiantocianidina, denominada carajurina. Posteriormente, Harborne (1998) e Scogin (1980) propuseram que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita a *Arrabidaea chica*. *Diversas substâncias foram identificadas nas folhas de A. chica por Takemura et al.* (1995), tais como antocianinas, flavonóides, taninos, fitoesteróis e flavona 7,4'-di-hidroxi-5-metoxiflavona e 6,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona, denominada carajuruflavona.

Williams & Grayer (2004) citam que mais de 50 novas antocianinas foram isoladas a partir de plantas, não somente das pétalas das flores, mas de frutos, folhas e sementes. Dentre estas novas agliconas destacam-se a 3-deoxiantocianidina, a 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium 1 e a 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium 2, que foram isoladas das partes aéreas da *Arrabidaea chica* juntamente com a conhecida 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (carajurina). As antocianinas são corantes naturais pertencentes à família dos compostos fenólicos da quais os flavonóides e fenilpropanóides também fazem parte.

As antocianinas desempenham importante papel nas interações de insetos com plantas para a polinização e dispersão de sementes. Também têm apresentado um papel importante nas interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores. Esta classe de compostos demonstrou atividade antiinflamatória e atividade anticâncer (Kong *et al.*, 2003).

Outra família que compreende espécies com importância medicinal é a *Asteraceae*. Considerada o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (Heywood, 1993). Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul. Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Zomlefer, 1994). Trabalhos científicos realizados com espécies da família *Asteraceae* apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque aos flavonóides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (Emerenciano *et al.*, 2001).

A bardana pertencente a família *Asteraceae*, cujo nome científico "*Arctium lappa*" deriva do grego "arctos" (= urso) e "lambanô" (= eu tomo), em alusão ao aspecto peludo da planta é originária da Europa, mas tudo indica que o Japão foi o primeiro país a cultivá-la para o consumo mais intenso. Conhecida popularmente como erva-dos-tinhosos, pegamassa, carrapicho-de-carneiro e carrapicho-grande essa planta pode crescer de 50 cm a 2 m de altura e produz um caule robusto, com folhas grandes, de coloração verde na página superior e acinzentada na inferior. As flores, de cor rosa-púrpura, surgem agrupadas em inflorescências. Valorizada como medicinal desde a antiguidade, além de possuir efeito diurético e ser utilizada como antiséptico, estudos científicos determinam a ela efeitos

antitumorais, antimicrobianos e antifúngicos (Correa *et al.*, 2002; Perin *et al.*, 2002; Gentil *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2005;) e ação inibitória em relação ao vírus HIV (Holetz *et al.*, 2002)

Em sua composição química destaca-se inulina, óleo essencial, lapatina, fuquinona, glicosídeos, mucilagens, princípio antibiótico, ácido clorogênico e vitaminas do complexo B (Panizza, 1998; Corrêa *et al.*, 2002). De acordo com Freitas *et al.* (2004) diversos fatores ambientais devem ser observados, época em que as folhas foram coletadas (estudo sazonal), pois este autor sugere que os metabólitos secundários produzidos por esta espécie são produzidos em função da interação planta-ambiente em resposta a alguns fatores químicos ou biológicos.

Se levarmos em consideração a quantidade de compostos naturais e sintéticos relatados como antifúngicos por revistas científicas, poderíamos pensar que se conta atualmente com uma variedade muito grande de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas. Entretanto, a realidade é muito diferente. Para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas (Selitrennikoff *et al.*, 1995), os quais apresentam sérios problemas. A anfotericina B, depois de 30 anos de uso, é ainda um fármaco usado para tratar infecções fúngicas sistêmicas. Entretanto é extremamente tóxico para as células humanas, e seu consumo crônico leva a nefrotoxicidade (Selitrennikoff *et al.*, 1995), além da farmacocinética deste fármaco não permitir sua administração oral (Goodman & Gilman, 1996).

As drogas azólicas principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia antifúngica. Esta classe de medicamentos tem como alvo a membrana celular dos fungos. São compostos totalmente sintéticos, cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição do esteroil-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana

com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo. Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, mas são menos potentes que a mesma. Podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo dos azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis. Além disso, os azóis ainda apresentam a desvantagem da resistência cruzada (Goodman & Gilman, 1996; Williams & Lemke, 2002). Existe um consenso geral de que são necessários novos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo mais seguros que os em uso atualmente (Selitrennikoff *et al.*, 1992). Nos últimos vinte anos, a frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente. Entre estas, a mais comum é a candidíase, seguida da aspergilose, que apresenta maior mortalidade. Paralelamente ao aumento dessas infecções vem ocorrendo a introdução no mercado de novos agentes antifúngicos, assim como o isolamento de cepas resistentes a essas drogas (Colombo *et al.*, 1995).

Como podemos constatar os medicamentos antifúngicos para infecções sistêmicas utilizados atualmente não satisfazem a necessidade médica completamente, devido a problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos agentes disponíveis. Considerando-se o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o conseqüente aumento na mortalidade populacional relacionada, percebemos que se faz necessárias a terapia e a escolha apropriada do antifúngico; além de profilaxia eficaz e desenvolvimento de medicamentos que aumentem a capacidade de resposta dos organismos imunocomprometidos. Atualmente existe um grande interesse na busca de novos compostos antifúngicos que atuem de modo seletivo e com baixa toxicidade.

Tratamentos não convencionais têm revelado bons resultados na terapia antifúngica. Estudos *in vitro* sugerem que inibidores de protease do HIV podem mostrar propriedade inibitória em relação aos fatores de virulência de *C. albicans*

(Cassone *et al.*, 1999). Estudos em animais revelaram a ação de inibidores de proteases como o Saquinavir e Amprenavir na redução da virulência desses microrganismos em candidose experimental (Korting *et al.*, 1999; Pichova *et al.*, 2001) sugerindo redução da incidência de infecções fúngicas em pacientes infectados pelo vírus HIV.

O potencial antifúngico dos inibidores de protease de HIV se deve ao fato das proteases do HIV pertencerem a mesma classe das proteases aspartato de *Candida* spp, que é um importante fator de virulência do fungo (Hoegl *et al.*, 1999; Korting *et al.*, 1999) As proteinases secretadas ou associadas à membrana celular de *Candida* degradam superfícies epiteliais demonstrando ter um importante papel nas etapas iniciais das infecções fúngicas (Borg & Ruchel, 1988; Ray & Payne, 1988).

Nas últimas décadas, tem-se demonstrado que as proteinases são fatores de virulência relevantes em alguns tipos de infecções causadas por *Candida albicans* e que a inibição dessa enzima revela um efeito protetor para o hospedeiro (Bernardis, 2001; Hube & Naglik 2001). Atualmente, estudos com agentes inibidores de proteinases têm sido o propósito de novas pesquisas aplicáveis ao controle da candidíase (Hoegl *et al.*, 1999) inclusive através do uso de plantas medicinais (Zhizhen *et al.*, 2002) As diferentes espécies que compõem o gênero *Candida* estão distribuídas em diferentes filos de acordo com as características de seus ciclos reprodutivos, podendo estar em estados anamórficos ou telemórficos. Existem ainda espécies que não apresentam estado perfeito conhecido, como é o caso de *Candida albicans*, principal espécie de interesse médico (Lodder, 1970). As leveduras do gênero *Candida* acham-se amplamente distribuídas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como saprófitas ou parasitas no homem e em outras espécies de animais homeotérmicos (Budtz & Jorgensen, 1990).

As espécies que fazem parte da microbiota normal da pele, boca e trato gastro intestinal são a causa mais freqüente de infecções fúngicas humanas e além de estarem presentes na cavidade bucal e peribucal, sua forma leveduriforme vive normalmente na orofaringe, nas dobras da pele, em secreções brônquicas, trato genito-urinário e gastrointestinal de humanos (Lacaz, 1980). Em condições normais, o hospedeiro mantém esses microrganismos como comensais, entretanto, alterações locais ou sistêmicas favorecem o desenvolvimento de fatores de virulência, causando danos para o homem, particularmente em infecções oportunistas como a candidíase (Aly *et al.*, 1975).

Candida albicans é um dos poucos microrganismos eucariotos que desenvolveu uma associação com o homem. Este fungo possui uma variedade de formas capazes de auxiliar sua sobrevivência como microrganismo comensal, mas como e em que circunstâncias os diferentes tipos morfológicos contribuem para sua patogenicidade ainda é pouco conhecida (Michael & Stephen, 1995).

A cavidade oral humana tem sido considerada um meio ambiente único, por oferecer uma variedade de nichos ecológicos para colonização microbiana. Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* spp habitam diferentes superfícies epiteliais do corpo, incluindo a mucosa oral, fazendo parte da microbiota residente (McCullough *et al.*, 1996). Além de *Candida albicans*, outras espécies têm sido isoladas, como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*. Segundo Stenderup (1990) a espécie de maior importância médica, pelo fato de ser agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas ocorridas na cavidade oral, é *Candida albicans*, e sua ocorrência neste local representam 60% a 70% dos isolados. Os mecanismos que determinam a patogenicidade do gênero *Candida* não estão ainda totalmente esclarecidos. Várias hipóteses têm sido sugeridas, tais como: fatores intrínsecos das espécies, aderência aos tecidos, dimorfismo, composição da parede celular e produção de toxinas e enzimas proteolíticas (Odds, 1987; Ghannoum & Abbu-Elteen, 1990). A

patogenicidade das espécies de *Candida* resulta de características próprias das cepas em questão e do estado imunológico do hospedeiro, assim como as condições locais dos sítios de infecção (Oksala, 1990; Mardegan *et al.*, 2006)

Dentre as espécies de *Candida*, a reconhecida como mais patogênica é *Candida albicans*, assim como outras espécies desse gênero, elas secretam enzimas proteolíticas que podem degradar destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo a uma disfunção e ou destruição física. A invasão das células dos tecidos do hospedeiro por tais microrganismos, implica em penetração e danos ao envelope externo celular sendo esse processo mediado por meios físicos e enzimáticos ou ainda pela combinação de ambos (Salyes & Witt, 1994)

As proteinases produzidas por *C. albicans* pode ser secretada ou, podem apresentar-se como proteinase aspartil, associada à membrana da célula, a qual é predominantemente expressa na maioria das espécies patogênicas do gênero *Candida* (Ray *et al.*, 1991)

Vários estudos de caracterização e sistemas de purificação destas enzimas têm revelado que a atividade proteolítica ácida extracelular de *C. albicans* é atribuída à aspartil proteinase secretada que é um polipeptídeo único de cadeia manoproteína com massa molecular entre 40 e 45 KDa, ótimas em níveis de pH entre 2,0 e 5,5, sendo que sua atividade máxima está em torno de pH 5,5. Geralmente essa aspartil proteinase é inativada em pH neutro e irreversivelmente desnaturada sob condições alcalinas (pH 7.5 a 8.5) e possui afinidade à diversos substratos como albumina, hemoglobina, caseína, queratina e colágeno desnaturado (Ruchel, 1981; Negi *et al.*, 1984; Ray & Payne, 1990) A aspartil proteinase secretada (SAP), é produzida pela maioria das cepas de *Candida albicans* (Ruchel *et al.*, 1982) assim como por *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis* e somente ocasionalmente e em menor quantidade, por *Candida*

parapsilosis, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida pseudotropicalis* (Ruchel & Boning, 1983; MacDonald, 1984).

Para induzir a secreção de enzimas proteolíticas de *Candida* spp vários meios de cultura enriquecidos com diferentes proteínas foram sugeridos. A secreção é pequena em meios contendo fontes de nitrogênio simples (aminoácidos ou sais de amônia), mas é elevada quando a única fonte de nitrogênio é uma proteína. A glicólise das fontes de carbono (açúcares) promove acidificação no meio, gerando um pH ácido obrigatório para sua produção e atividade (Ray & Wuepper, 1976). As enzimas são secretadas in vitro, quando os microrganismos são cultivados na presença de proteínas exógenas (Albumina do Soro Bovino -BSA é o mais utilizado) como fonte de nitrogênio (Angiolella *et al.*, 1996; Homma *et al.*, 1992; Ray & Payne, 1990). Essas proteínas exógenas no meio de cultura, não são essenciais para indução da produção das proteinases, entretanto, o pH do meio possui atividade direta sob a síntese dessas enzimas (Homma *et al.*, 1992). Em alguns casos, a indução das aspartil proteinases secretadas (SAPs) por *Candida albicans* parecem envolver sinais de transdução, evento que ocorre em nível de membrana plasmática (Lerner & Goldman, 1993)

Dentre os métodos utilizados para analisar cepas virulentas, o método de cultivo em placa, descrito por Ruche *et al.*, (1982), que consiste em cultivar as amostras em meio sólido enriquecido com albumina, tem sido bastante utilizado em pesquisas científicas, visto que a atividade enzimática das proteinases pode ser utilizada como marcador do potencial de virulência (MacDonald, 1984; Sono *et al.*, 1992; Candido *et al.*, 2000; Penha *et al.*, 2000; Mardegan *et al.*, 2006)

Estudos com o genoma de *C. albicans*, demonstraram a presença de pelo menos 10 genes distintos que codificam a aspartil proteinase extracelular (Monod *et al.*, 1994; Niimi *et al.*, 1997). Cada SAP parece ter um papel específico, ou uma fase em que é mais ativa (Bernardis *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 1999). O papel das SAPs, pode ser unicamente digerir proteínas do hospedeiro para promover

uma fonte de nitrogênio para a célula, contribuindo para adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (Hube & Naglik, 2001).

Assim a utilização de inibidores de proteinases de *Candida* spp pode representar uma importante estratégia de controle e prevenção de infecções como as candidíases em mucosas, frequentemente observadas em pacientes imunodeprimidos. Visando contribuir na busca de novos agentes antifúngicos para uma terapia alternativa ou futuramente para a elaboração de novos fármacos, a presente tese foi realizada com o intuito de rastrear possíveis extratos vegetais com atividade inibitória sobre *Candida* spp e sobre proteinases sintetizadas por *Candida albicans*.

3 Proposição

O presente estudo teve como propósito:

- Avaliar a atividade anticandida de extratos vegetais (diclorometânico e metanólico) de: *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Arctium lappa*, *Casearia sylvestris*, *Arrabidaea chica* e *Tabebuia avellanedae* frente a cepas padrão de *Candida* spp (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*) e em isolados clínicos de *Candida albicans* obtidas da cavidade bucal de crianças sem candidose e de adultos com doença periodontal.
- Verificar a capacidade dos extratos vegetais de atuarem na inibição da atividade proteolítica de proteinases produzidas por *Candida albicans*.

4 Material e Métodos

4.1 Plantas

As plantas selecionadas para este estudo, indicadas pelo Prof. Dr. Valter Radamés Accorsi foram provenientes da coleção botânica do campo experimental da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O material botânico foi identificado pelo Prof: Dr. Jorge Yoshio Tamashiro com depósito de excicata no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp. As plantas estão ilustradas na figura 1 e relacionadas na tabela 1.

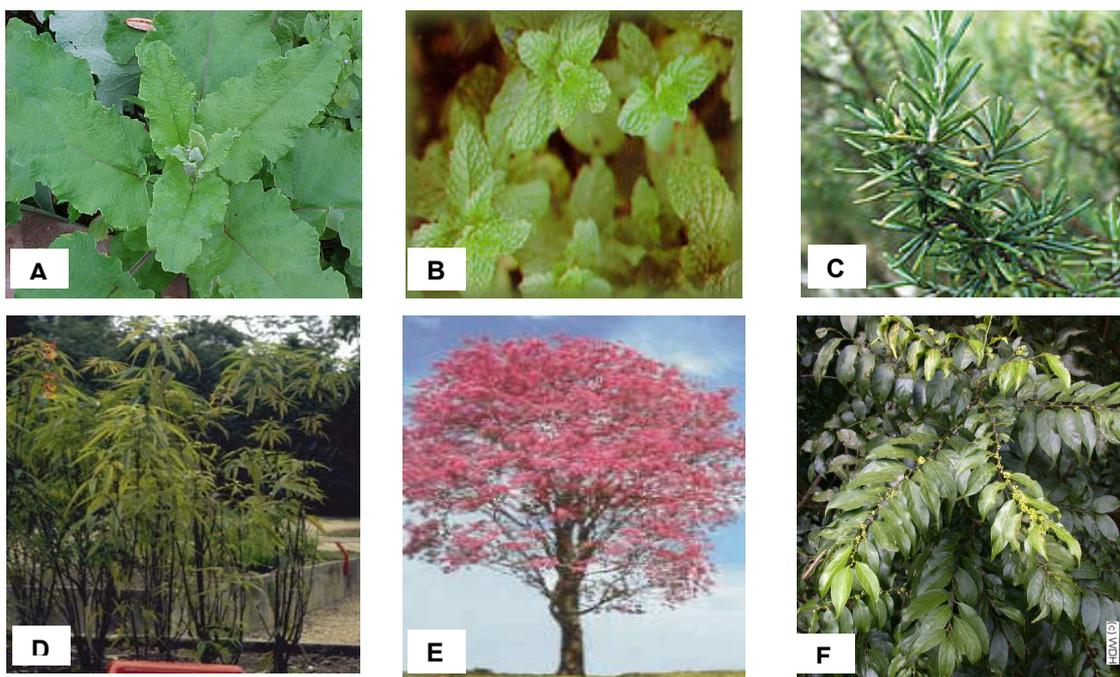


Figura 1 - Plantas selecionadas para o estudo, utilizadas para avaliar a atividade antifúngica: A) *Arctium lappa* (Bardana); B) *Mentha piperita* (Hortelã); C) *Rosmarinus officinalis* (Alecrim); D) *Arrabidaea chica* (Pariri); E) *Tabebuia avellaneda*; F) *Casearia Sylvestris*.

Tabela 1 – Plantas selecionadas, parte utilizada e número excicata

Nome científico	Nome popular	Família	Parte utilizada	Número excicata (UEC)
<i>Arctium lappa</i> (Hill) Bernh.	Bardana, pergamasso, carrapichão, erva dos tinhosos.	<i>Asteraceae</i>	Folhas	1265
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã, hortelã pimenta, menta, menta-inglesa	<i>Lamiaceae</i>	Folhas	1253
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim, alecrim de cheiro, rosmarino, rosmarinho.	<i>Lamiaceae</i>	Folhas	1264
<i>Arrabidaea chica</i> (Bonpl.) B. Verl.	Crajiru, carajuru, chica, pariri, cipó-cruz, pariri-piranga	<i>Bignoneaceae</i>	Folhas	1254
<i>Tabebuia avellanedae</i> Lor. Ex Griseb.	Ipê-rosa, ipê roxo, pau-d'arco, peúva, piúva.	<i>Bignoneaceae</i>	Entrecasca	1256
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Guaçatonga, café-bravo, cafezinho do mato, vassitonga	<i>Flacourtiaceae</i>	Folhas	1257

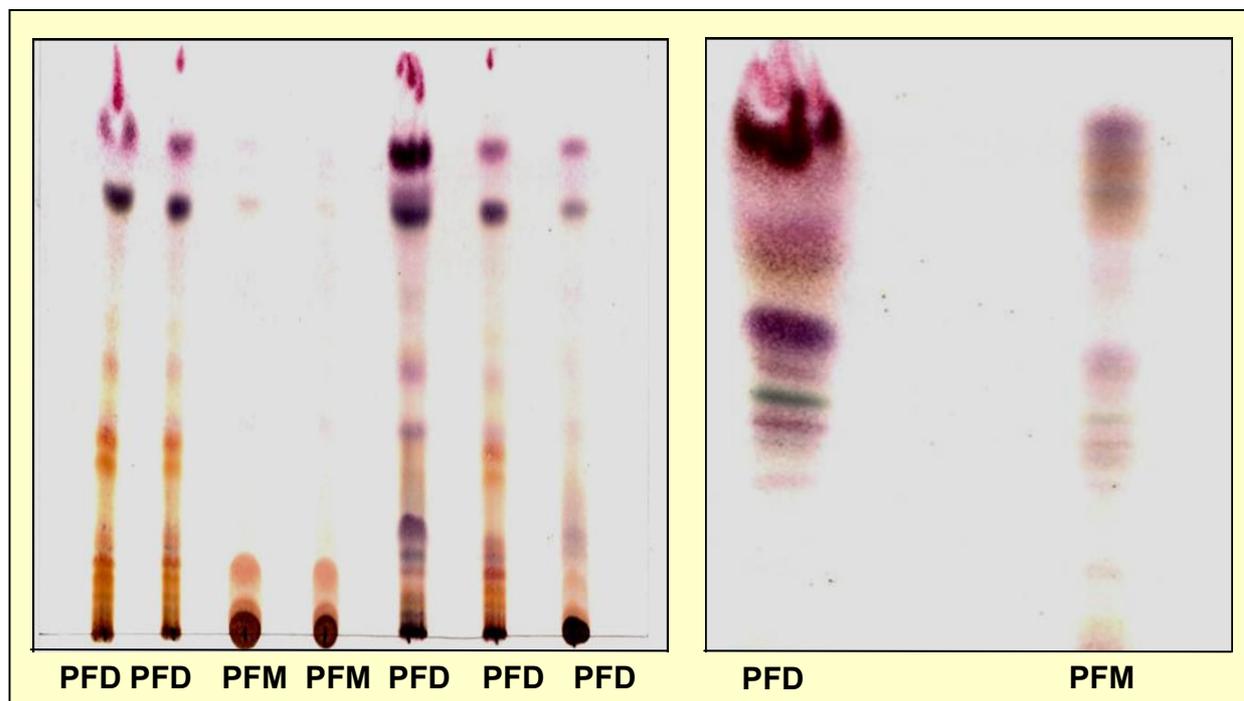
4.2 Preparação dos Extratos

O preparo dos extratos das plantas selecionadas (Tabela 1) foram feitos através de turbolização, onde o processo de extração ocorre concomitantemente com a redução do tamanho de partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento. A redução drástica do tamanho de partícula e o conseqüente rompimento das células favorecem a rápida dissolução das substâncias ativas, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento das substâncias presentes no material vegetal. O aparelho utilizado para fazer a extração de pequenas quantidades da droga em laboratório foi o Dispensor Extratur (Quimis® – modelo Q – 252-28).

As plantas imediatamente após serem coletadas e lavadas, foram separadas em alíquotas de 5 gramas do material vegetal fresco (duplicata). A extração iniciou-se com adição de diclorometano – CH₂ Cl₂ (até total esgotamento do material vegetal). Em seguida, ao mesmo resíduo vegetal foi adicionado metanol – MeOH (até total esgotamento). Os solventes foram eliminados sob vácuo em rotaevaporador (Buchi® Modelo R-200) finalizando o preparo do extrato bruto. Esse material foi posteriormente pesado para determinar o rendimento do processo extrativo (massa bruta).

4.3 Biomonitoramento do Processo Extrativo por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os monitoramentos da viabilidade dos extratos vegetais foram feitos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatoplasmas de silicagel (60 F 254 Merk 1.05554). Pequenas alíquotas dos extratos eram distribuídas com capilar de vidro nas cromatoplasmas e após a secagem do material vegetal, eram preparados soluções com solventes de diferentes polaridades, que atuavam como eluente nas cromatoplasmas. Posteriormente uma solução reveladora de anisaldeído era pulverizada sobre a placa já seca, e em seguida, submetia-se ao aquecimento em estufa Corporation-Precision (110 °C, 5 minutos). Depois de reveladas, as cromatoplasmas eram analisadas para avaliar a eficiência e reprodutibilidade do processo extrativo (Figura 2).



Arrabidaea chica (Bonpl.) B. Verl. PFD=Material vegetal extraído com diclorometano; PFM= Material vegetal extraído com metanol.

Mentha piperita L. PSD=Material vegetal extraído com diclorometano; PSM= Material vegetal extraído com metanol.

Figura 2 - Biomonitoramento do processo extrativo por CCD

4.4 Limpeza do Extrato

Quando o extrato bruto vegetal obtido possuía uma cor muito escura (devido à presença de clorofilas) os mesmos, passavam por um processo de desclorofilção, no qual 30% de carvão ativo era inserido no peso total do extrato bruto. O procedimento era feito em um erlenmeyer com adição de metanol e o material submetido à agitação durante 2 horas. Posteriormente os extratos eram filtrados em funil de placa porosa contendo terra diatomácea (Celite®) e lavados com metanol (100 ml). O solvente era eliminado sob vácuo em rotaevaporador, fornecendo o extrato bruto sem clorofilas.

4.5 Diluição dos Extratos Vegetais

Partindo do peso seco do extrato bruto vegetal, as soluções estoque eram preparadas (concentração de 5 mg/mL) adicionando-se DMSO a 5% em água destilada estéril. As soluções estoque eram armazenadas sob refrigeração. Quando utilizadas para realização dos testes microbiológicos, a solução estoque era novamente dissolvida até chegar às concentrações desejadas e então passavam por um processo de esterilização por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm (Milipore) e posteriormente em filtro de 0,22 µm (Milipore). As concentrações estão expostas na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações dos extratos vegetais

Diluições	Concentrações (µg/ml)	Concentrações final
Diluição 1 (D1)	5.000*	2.500**
Diluição 2 (D2)	4.500*	2.250**
Diluição 3 (D3)	4.000*	2.000**
Diluição 4 (D4)	3.500*	1.750**
Diluição 5 (D5)	3.000*	1.500**
Diluição 6 (D6)	2.500*	1.250**
Diluição 7 (D7)	2.000*	1.000**
Diluição 8 (D8)	1.500*	750**
Diluição 9 (D9)	1.000*	500**
Diluição 10 (D10)	500*	250**

* Diluições com água destilada estéril; ** Diluições finais do extrato vegetal após a adição do meio de cultura RPMI-1640 (Concentrado 2 X) contendo o inóculo de levedura (5×10^3 UFC/ml).

4.6 Preparo e Diluição dos Antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol

As amostras foram testadas em relação à sua suscetibilidade a antifúngicos pelo método da microdiluição em caldo, realizada de acordo com a padronização publicada no documento M27-A do “National Committee for Clinical Laboratories Standards” (NCCLS, 1997). Além dos isolados clínicos, em cada bateria de ensaios foi incluído um microrganismo padrão, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) para um controle de qualidade da atividade das drogas, uma vez que é conhecida a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos utilizados para este microrganismo (Rex *et al.*, 1996; Wanger *et al.*, 1995; NCCLS, 1997). O meio de cultura utilizado nos testes foi o RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) diluído apropriadamente em água destilada esterilizada (Concentrado 2X) e posteriormente esterilizado em Membrana Millipore 0,22 µm. Cada droga testada foi diluída previamente, em dez diferentes concentrações, a saber: Fluconazol 1,25 – 640 µg / mL, e Anfotericina B 0,3 – 160 µg / mL. As diferentes concentrações de cada antifúngico foram novamente diluídas a 1:5 em RPMI-1640 e alíquotas de 100 µl destas concentrações dispensadas seqüencialmente nas placas de diluição, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. A menor concentração capaz de induzir proeminente inibição (em torno de 50%) do crescimento da levedura testada, em relação ao poço controle, foi identificada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da droga para este microrganismo, em relação ao fluconazol, e foram classificadas como Sensíveis (S), Suscetibilidade Dependente de Concentração (SDC) e Resistentes (R), de acordo com os valores de referência do NCCLS (1997) apresentados na Tabela 3. Para a Anfotericina B, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi identificada como a menor concentração da droga no meio livre de crescimento da levedura, e foram classificadas como Sensíveis (S) ou Resistentes (R).

Tabela 3 - Critérios de susceptibilidade a Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol e Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$). Valores de referência do NCCLS

	Fluconazol	Anfotericina B
S	≤ 8	≤ 1
SDC	16 e 32	—
R	≥ 64	≥ 2

S – Sensível; **SDC** – Susceptibilidade Dose Dependente; **R** – Resistente.

4.7 Cepas de Microrganismos

Para o desenvolvimento da presente pesquisa, foram utilizadas cepas padrão de diversas espécies de *Candida* spp (Tabela 4) e cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal (mucosa) de voluntários portadores de doença periodontal e da cavidade bucal (mucosa) de crianças saudáveis, pertencentes a Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP)

Tabela 4 - Cepas padrão de *Candida* spp

Código	Gênero e Espécie
CBS - 562	<i>Candida albicans</i>
CBS - 94	<i>Candida tropicalis</i>
CBS - 604	<i>Candida parapsilosis</i>
CBS - 7987	<i>Candida dubliniensis</i>
CBS - 573	<i>Candida krusei</i>

As amostras clínicas que foram utilizadas neste estudo, fazem parte de dois subgrupos de voluntários selecionados da Clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP, sob autorização do Comitê de Ética em Pesquisa

(008/2003 e 021/2002), as quais foram coletadas da mucosa oral e identificadas através do cultivo em meio cromogênico CHROMagar-Candida e por testes morfológicos e bioquímicos de fermentação e assimilação de carboidratos. Posteriormente, foram armazenadas a -70°C em meio YPD-Glicerol a 15% na Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP (Tabela 5).

Tabela 5 - Amostras clínicas de crianças e adultos

Nº de Voluntários	Idade	Nº de isolados	Espécie	Comitê ética
10	24 a 36 meses	100	<i>Candida albicans</i>	021 / 2002
10	30 a 60 anos	100	<i>Candida albicans</i>	008 / 2003

4.8 Teste da Proteinase

O teste para selecionar as cepas produtoras de proteinase foi realizado segundo a metodologia descrita por Price *et al.*, (1982), com algumas modificações. Os isolados clínicos foram inoculados em tubos contendo 5 mL de meio de cultura YPD e incubadas a 37°C durante 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, alíquotas de 1,5 mL da cultura foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 3.000 rpm, por 5 minutos a 4°C . Os pellets de células foram ressuspendidos em solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugados por mais duas vezes nas mesmas condições, para remoção dos restos de meio de cultivo. As concentrações das suspensões das cepas foram padronizadas, usando-se o índice 0,5 da Escala MacFarland (aproximadamente 1×10^6 UFC / mL) e volumes de 1 μL foram inoculados em pontos equidistantes, no meio Ágar Proteinase (Candido *et al.*, 2000). As placas contendo quatro inóculos de diferentes cepas foram incubadas a 37°C durante 7 dias (Ruchel *et al.*, 1982) e a medida da

atividade enzimática foi feita de acordo com a metodologia descrita por Price *et al.*, (1982), demonstrada na Tabela 6. Os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 6 - Medidas da atividade enzimática

Valores de PZ	Atividade Enzimática	Código/Índice
PZ = 1	Negativa	0
$PZ \geq 0,64 < 1$	Positiva-Média	1
$PZ \leq 0,63$	Positiva-Elevada	2

* A medida da atividade enzimática (PZ), proposta por Price *et al.*, 1982.* Zona de Precipitação (PZ) é calculada, dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a Zona de precipitação.

4.9 Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos

O preparo dos inóculos para os testes de susceptibilidade seguiram as recomendações do protocolo M-27-A2 do NCCLS 2002 (atual CLSI). Os microorganismos a serem testados foram cultivados durante 24 horas (*C. albicans*) e ou 48 horas (*Candida* spp) em Agar Sabouraud Dextrose. Apartir de cada microrganismo foi preparada uma suspensão inicial medida em espectrofotometro a 530 nm, com transmitância ajustada para 90%. Apartir de cada suspensão inicial foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI-1640 para obtenção do inoculo final ($0,5 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC / mL. Cada extrato vegetal ou droga testada (Anfotericina B e Fluconazol) foi previamente diluído em 10 diferentes concentrações que foram posteriormente inseridas nas placas de microtitulação. Alíquotas de 100 µL do inoculo final foram, da mesma forma, adicionadas nas placas (diluição 1:1) obtendo as concentrações finais desejadas para cada droga e inoculo. As placas foram inoculadas a 35 °C durante 48 horas. Após decorrido o tempo de incubação, as placas foram analisadas e a menor concentração capaz de induzir proeminente inibição do crescimento das leveduras testadas que foi observada pela mudança da cor do meio de cultura foi caracterizada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da droga em relação ao microrganismo. As

CIMs do Fluconazol puderam identificar a resistência ou susceptibilidade de cada isolado que foram classificados como Sensíveis (S), Suscetibilidade Dependente da Concentração (SDC) e Resistentes (R) de acordo com os valores de referência do NCCLS (1997) anteriormente descritos (Tabela 3). Para a Anfotericina B, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi identificada como a menor concentração da droga no meio livre de crescimento da levedura, e foram classificadas como Sensíveis (S) ou Resistentes (R). Em relação a MIC dos extratos vegetais, foi utilizada a classificação sugerida por Aligiannis *et al.*, 2001 (Tabela 7). Foram incluídos controles para validação do protocolo: 1) meio de cultura inoculado com microrganismo; 2) meio de cultura inoculado com microrganismo acrescido do solvente de cada droga; 3) meio de cultura sem o inóculo, acrescido dos extratos vegetais ou das drogas controle. Cada teste foi realizado em duplicata

Tabela 7 - Valores de inibição para testes com material vegetal

Inibição	Valores de CIM
Forte inibição	(CIM menor ou igual a 500 µg / mL)
Moderada inibição	(CIM entre 600 e 1500 µg / mL)
Fraca inibição	(CIM igual ou maior a 1600 µg / mL)

CIM – Concentração Inibitória Mínima.

4.10 Teste Detectar Inibição da Atividade Proteolítica das Proteinases de *Candida Albicans*

Foram selecionadas um total de 20 isolados (10 de crianças e 10 de adultos) que apresentaram elevado índice de produção de proteinase para este teste. Os isolados foram cultivados por 48 horas a 37°C em Sabouraud / glucose. A indução das proteinases de *Candida albicans* foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido por Korting *et al.*, (1999), com algumas modificações. Alíquotas de 100 µL de suspensão de *C. albicans* foram cultivadas em 10 mL de meio

líquido indutor de proteinase (BSA / YNB) e incubadas por 7 dias a 27 °C em um *shaker* a 150 rpm. Decorrido o tempo de incubação a CFU / mL foi determinada e as células das levedura foram removidas por centrifugação a 1500g por 30 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi ajustado para um pH 6,5 (limite da autodegradação) e resfriado a -20 graus, depois de esterilizado por filtração, finalizando a preparação bruta da enzima. Em seguida, 500µL do extrato bruto contendo proteinase foram adicionados a 500 µL de BSA a 2% (em tampão HCl / Citrato de Sódio a 0,2 M) e 500 µL de cada extrato vegetal separadamente em diferentes concentrações (2,5 mg/mL; 1,5 mg/mL; 0,5 mg/mL). Foram também realizados testes com drogas inibidoras de protease como Amprenavir (APV – Agenerase® / Glaxo Smith kline), Ritonavir (RTV – Norvir® / Abbott) e Pepstatina A (Sigma) nas mesmas concentrações. Controles do experimento incluíram ensaios sem adição dos extratos vegetais e das drogas inibidoras de protease, assim como um controle contendo o diluente da droga vegetal (DMSO a 5% em água destilada estéril) e com as substancias utilizadas como diluentes dos inibidores de protease (DMSO a 15% em água destilada estéril). Para testar as reações, o material foi incubado em estufa a 37 °C durante 60 minutos. Os experimentos foram realizados em duplicata. Após o período de incubação, as reações foram interrompidas com 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) e estocadas em gelo. Para cada mistura de reagentes, um controle adicional foi preparado, adicionando TCA a 20% em água destilada estéril simultaneamente antes do período de incubação, que foi determinado como tempo inicial (TO) no cálculo para obtenção dos índices de atividade proteolítica. Após a adição do TCA, todos os espécimes foram centrifugados a 3.000 rpm durante 30 minutos a temperatura de 4 °C.

Num segundo momento da realização dos testes, alíquotas de 160 µL do sobrenadante da cultura de cada amostra foram colocadas em placas de diluição e posteriormente foram adicionados 40µL de reagente corante (Coomassie Brilliant Blue – G-250, Bio-Rad). Os peptídeos produzidos devido a atividade

proteolítica não foram precipitados pelo TCA e se ligaram ao corante. A quantidade de peptídeos no sobrenadante pode então ser medida em leitor automático de microplacas a absorvância de 595 nm (valor máximo para o corante) e relacionada com a atividade proteolítica.

O cálculo da atividade proteolítica foi obtido através da formula: Valor de absorvância da amostra medida no tempo final (TF), após o período de 60 minutos em estufa, menos o valor de absorvância da amostra anteriormente ao período de incubação, que foi chamado de tempo inicial (TO). A atividade foi calculada a partir da variação (aumento) de 0,1 unidade durante 60 minutos a 595 nm. Todos os testes foram realizados em duplicata.

5 Resultados

5.1 Seleção de Cepas de *Candida Albicans* com Elevada Atividade Proteolítica

Para selecionar as cepas com alta atividade proteolítica, utilizadas neste estudo, foi realizado o teste da proteinase com 200 amostras clínicas de *Candida albicans*, sendo 100 amostras provenientes da cavidade bucal de crianças saudáveis e 100 amostras provenientes da cavidade bucal de adultos. As amostras foram recentemente isoladas, identificadas e armazenadas a -20 °C. Todas as cepas foram reativadas para que se pudesse proceder ao teste da atividade proteolítica (Figura 3).

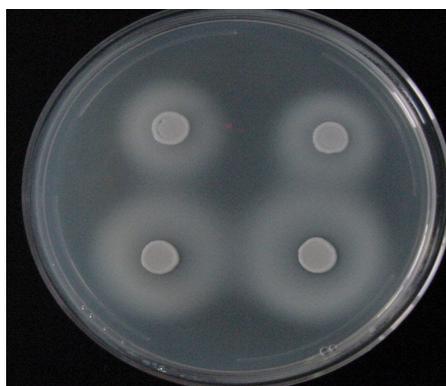


Figura 3 – Cepas de *Candida albicans* cultivadas em ágar proteinase. Cultivo de 4 cepas de *Candida albicans* em Ágar proteinase. Após o período de incubação, zonas de degradação podem ser observadas ao redor das colônias de leveduras.

Para quantificar a atividade enzimática foi utilizado o cálculo proposto por Price *et al.*, 1982, que consiste em dividir o diâmetro da colônia, pelo diâmetro da

colônia mais a zona de precipitação ao redor das colônias de leveduras (Figura 4). Para quantificar a produção de proteinase, foram usados os índices 0 (zero), para aquelas que não demonstraram atividade enzimática, 1 (um), para cepas com atividade enzimática positiva e 2 (dois), para cepas com atividade enzimática positiva elevada.

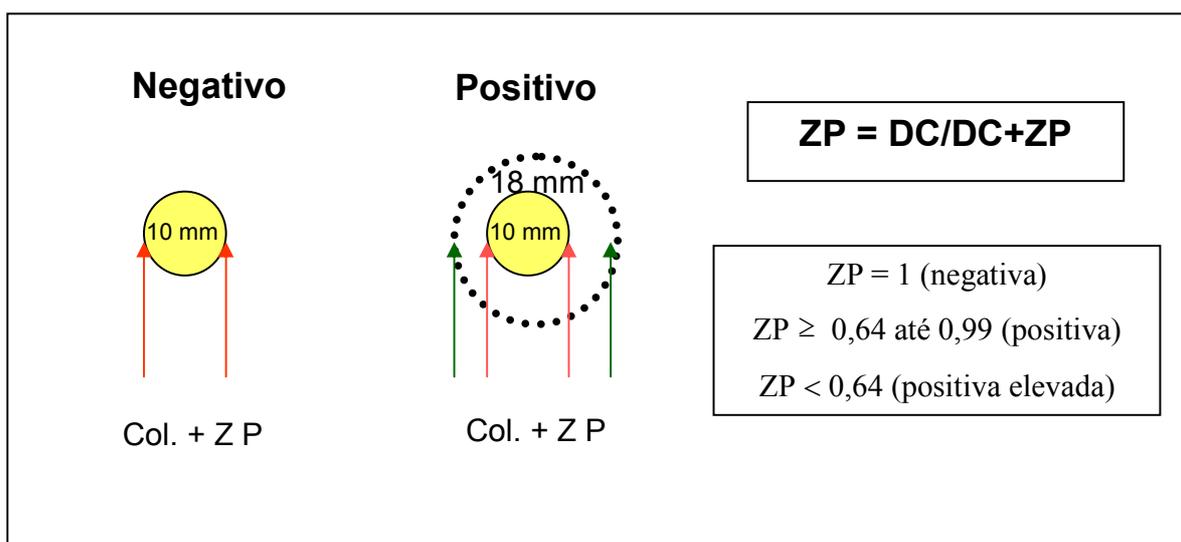


Figura 4 – Cálculo da atividade enzimática. Cálculo utilizado para medir a atividade enzimática de colônias de *Candida albicans*, descrito por PRICE *et al.*, 1982. ZP – Zona de Precipitação; DC – Diâmetro da Colônia.

De 100 amostras clínicas isoladas de crianças saudáveis 94% foram positivas para produção de proteinase (incluindo índices 1 e 2) e o restante, 6% demonstraram atividade enzimática negativa para essa enzima. Do grupo de isolados obtidos da cavidade bucal de adultos com doença periodontal 95% demonstraram atividade proteolítica (incluindo índices 1 e 2) e 5% foram negativas em relação a produção dessa enzima (Figuras 5, 6)

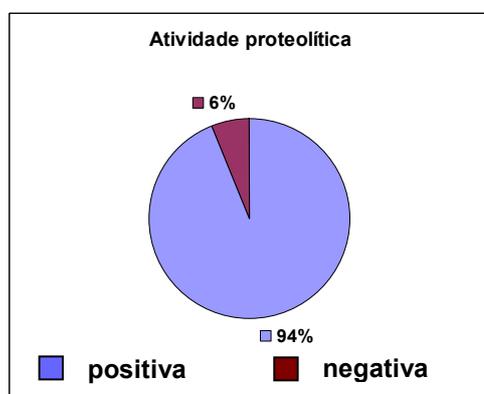


Figura 5 - Frequência de cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de crianças saudáveis com atividade enzimática para proteinase positiva (incluindo índices 1 e 2) e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa, índice 0.

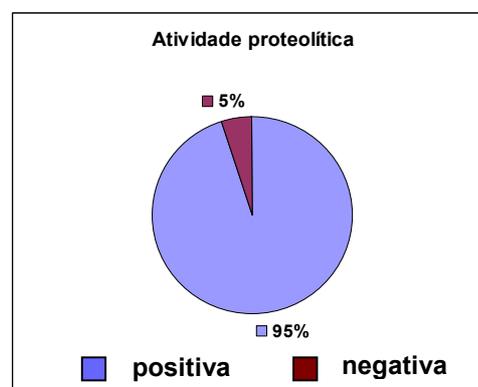


Figura 6 - Frequência de cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de adultos com doença periodontal com atividade enzimática para proteinase positiva (incluindo índices 1 e 2) e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa, índice 0.

A Tabela 8 apresenta o perfil da atividade enzimática das proteinases produzidas por *C. albicans* utilizando a classificação proposta por Price *et al.*, 1982.

Tabela 8 - Perfil da atividade enzimática da proteinase produzida por *C. albicans*, isoladas de crianças saudáveis e adultos com doença periodontal

Isolados de <i>Candida albicans</i>	Número (%) de isolados com diferentes índices de produção de proteinase		
	Índice 0 (-)	Índice 1 (+)	Índice 2 (++)
Crianças	6%	2%	92%
Adultos	5%	1%	94%

(-) atividade proteolítica negativa; (+) atividade proteolítica positiva; (++) atividade proteolítica positiva elevada).

Após os resultados obtidos nestes testes preliminares, 50 cepas de *Candida albicans* com alta atividade proteolítica (Índice 2) provenientes da cavidade bucal de crianças saudáveis e 50 provenientes da cavidade bucal de

adultos com doença periodontal, foram selecionadas para os demais testes. Além desses isolados clínicos foram utilizadas cepas padrão de *Candida* spp (Tabela 4).

5. 2 Testes para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados das CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas) dos extratos diclorometânico e metanólico (nas concentrações de 250 a 2500 µg/ml) de todas as plantas frescas testadas em cepas padrão de *Candida* spp estão expressos na Tabela 9. Dados da literatura indicam que forte, moderada ou fraca atividade inibitória correspondem a CIMs (µg-mL) de até 500, entre 500 e 1500, e acima de 1500 respectivamente (Aligiannis *et al.*, 2001)

Os extratos metanólicos de *Rosmarinus officinalis*, *Tabebuia avellanadae*, *Arctium lappa* e *Casearia sylvestris* foram inativos em relação a todas as cepas padrão de *Candida* spp testadas. O extrato metanólico de *Mentha piperita* inibiu *C. parapsilosis* com CIM de 2250µg/ml, porém foi inativo em relação às demais espécies. O mesmo extrato da planta *Arrabidaea chica* inibiu *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C tropicalis* e *C. krusei* com CIMs de 1500 µg/mL, 1250 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente.

Em relação aos resultados obtidos com os extratos diclorometânicos de *R. officinalis* pudemos observar a inibição do crescimento de *C. krusei* com CIM de 2250 µg/mL e as demais espécies com CIM de 2000 µg/ml. *Mentha piperita* inibiu o crescimento de *C. tropicalis* com CIM de 1500 µg/mL, e as demais cepas com CIM de 1750 µg/mL. Em relação à *Tabebuia avellanadae* esse extrato inibiu *C. tropicalis* com CIM de 1750 µg/mL, *C dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C krusei* com CIM de 1500 µg/mL e *C. albicans* com CIM de 1250 µg/mL. Em relação à *Arrabidaea chica* a inibição das cepas ocorreram sempre com CIMs superiores a

2000 µg/mL. O mesmo ocorreu em relação ao extrato de *Arctium lappa*, a inibição ocorreu em CIMs igual ou superiores a 1750 µg/mL. Para *Casearia sylvestris* as CIMs para *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* foram iguais (2000 µg/mL), *C. parapsilosis* foi inibida com CIM de 1250 µg/mL e *C. albicans* e *C. krusei* demonstraram ser mais sensíveis e foram inibidas com CIM de 1000 µg/mL (Tabela 9.)

Tabela 9 - Cepas padrão e CIMs dos extratos (diclorometanicos e metanólicos)

Concentração Inibitória Mínima em cepas padrão de <i>Candida</i> spp						
Atividade anticandida (CIM - µg/mL)						
Plantas	Extrato	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	DC	2000	2000	2000	2000	2250
	MT	*	*	*	*	*
<i>Mentha piperita</i>	DC	1750	1750	1750	1500	1750
	MT	*	*	2250	*	*
<i>Tabebuia avellanedae</i>	DC	1250	1500	1500	1750	1500
	MT	*	*	*	*	*
<i>Arrabidaea chica</i>	DC	2000	2250	2250	*	2250
	MT	1000	1250	1500	750	500
<i>Arctium lappa</i>	DC	1750	1750	2000	2000	1750
	MT	*	*	*	*	*
<i>Casearia sylvestris</i>	DC	1000	2000	1250	2000	1000
	MT	*	*	*	*	*

Concentração testada: 2500 µg/mL a 250 µg/mL * Valores de CIM maiores que 2500µg/mL.

Através do gráfico (Figura 7) podemos observar que a atividade antifungica dos extratos metanólicos testados foram fracas. Apenas o extrato metanólico de *Arrabidaea chica* demonstrou ser efetivo em cepas padrão de *Candida* spp. Em relação a *Candida krusei* o extrato apresentou forte atividade inibitória (CIM ≤ 500

µg/mL). Para as demais espécies a atividade foi moderada (CIMs de 600 a 1500 µg/mL).

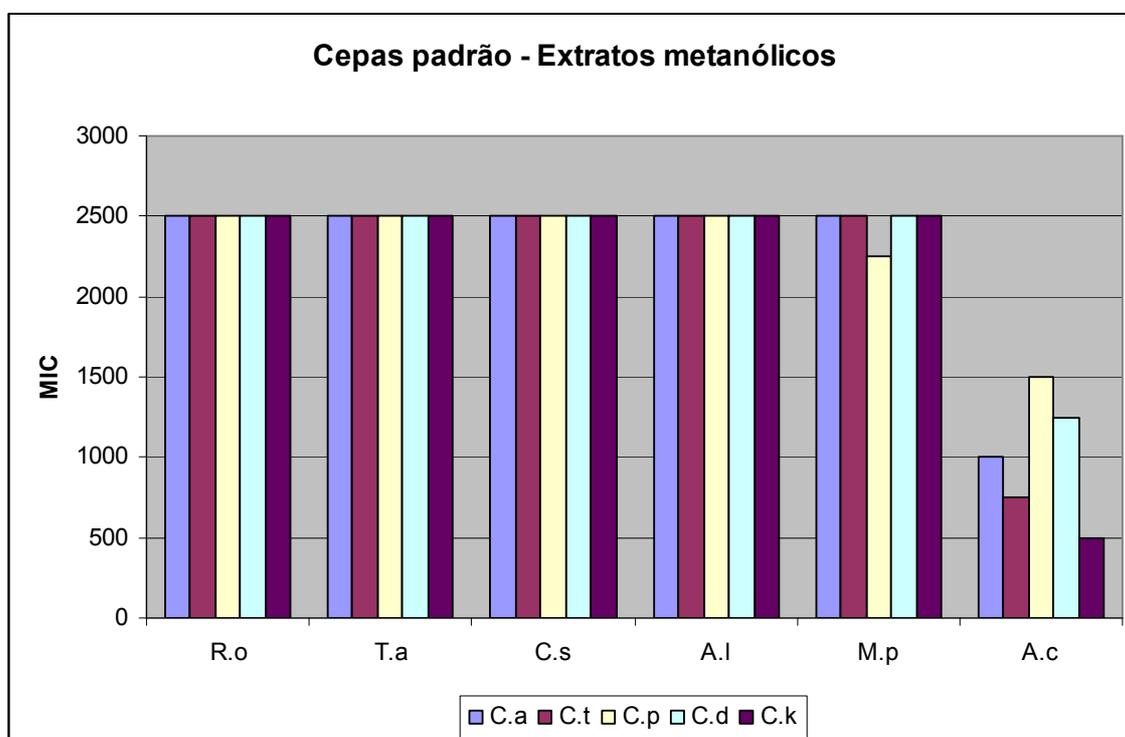


Figura 7 - Os valores de CIMs estão em µg/mL; C.a: *Candida albicans*; C.t: *Candida tropicalis*; C.p: *Candida parapsilosis*; C.d: *Candida dubliniensis*; C.k: *Candida krusei*. – R.o: *Rosmarinus officinalis*; T.a: *Tabebuia avellanedae*; C.s: *Casearia sylvestris*; A.l: *Arctium lappa*; M.p: *Mentha piperita*; A.c: *Arrabidaea chica*.

Através do gráfico (Figura 8) podemos observar que a atividade antifúngica dos extratos diclorometânicos testados. Os extratos de *R. officinalis*, *A.lappa* e *A. chica* foram pouco efetivos em relação a todas as cepas padrão. Nenhuma cepa padrão foi inibida com CIM ≤ 500 µg/ml (forte inibição).

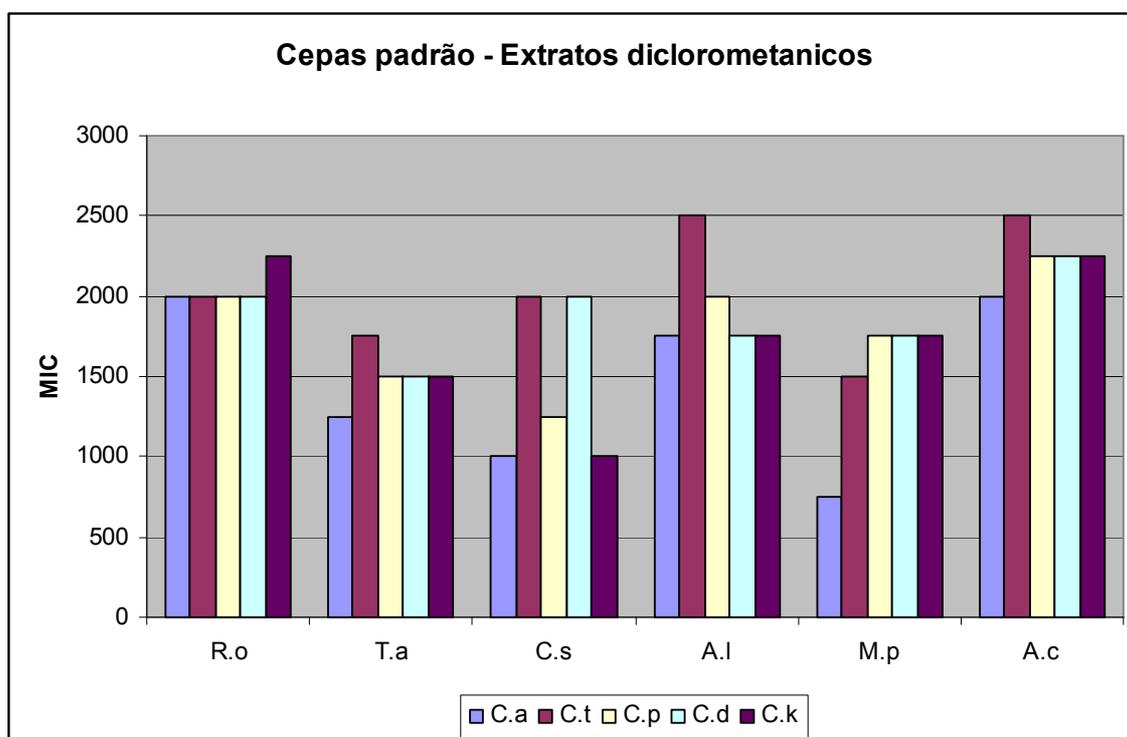


Figura 8 - Os valores de CIMs estão em $\mu\text{g/mL}$; C.a: *Candida albicans*; C.t: *Candida tropicalis*; C.p: *Candida parapsilosis*; C.d: *Candida dubliniensis*; C.k: *Candida krusei*. – R.o: *Rosmarinus officinalis*; T.a: *Tabebuia avellanedae*; C.s: *Casearia sylvestris*; A.l: *Arctium lappa*; M.p: *Mentha piperita*; A.c: *Arrabidaea chica*.

Quando os testes de CIM dos extratos vegetais foram realizados em amostras clínicas de crianças ($n=50$) e de adultos ($n=50$) os resultados também demonstraram que os extratos diclorometânico e metanólico de *Rosmarinus officinalis* foram pouco efetivos apresentando valores de CIM considerados elevados (CIM acima de $1600 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Amostras clínicas de *C. albicans* e respectivos valores de CIM (%) nos testes realizados com extratos diclorometânico e metanólico de *R. officinalis*

Extratos	CIMs (%) de extratos de <i>Rosmarinus officinalis</i> (µg/ml)	
	Crianças (n = 50)	Adultos (n = 50)
Diclorometano	4% - 2250	38% - 2000
	78% - 2000	62% - 2250
	18% - 1750	
Metanol	48% - 2500	78% - 2250
	52% - 2250	22% - 2500

Quando foram testados os extratos de *Mentha piperita*, os valores de CIM demonstraram que o extrato metanólico foi menos efetivo (CIMs \geq 2000 µg / mL) em relação ao extrato diclorometânico. Em relação às amostras clínicas de crianças e adultos o extrato diclorometânico apresentou moderada atividade em 68% e 62% dos isolados clínicos, respectivamente. Fraca atividade inibitória foi observada em 32% das amostras clínicas de crianças e em 38% das amostras clínicas de adultos (Tabela 11).

O extrato metanólico de *Tabebuia avellanedae* apresentou fraca atividade inibitória sobre os isolados com CIMs superiores a 2000 µg / mL. Apenas 12% das amostras isoladas de crianças e 2% das amostras isoladas de adultos apresentaram moderada atividade inibitória (Tabela 12) em relação aos testes com extrato diclorometânico de *T. avellanedae*, 88% e 98% das amostras de crianças e adultos respectivamente foram inibidas com valores de CIMs elevados sendo caracterizado como fraca atividade inibitória.

Tabela 11 - Amostras clínicas de *C. albicans* e respectivos valores de CIM (%) nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de *M. piperita*

Extratos	CIMs (%) de extratos de <i>Mentha piperita</i> (µg/ml)	
	Crianças (n = 50)	Adultos (n = 50)
Diclorometano	2% - 2000	8% - 2000
	30% - 1750	30% - 1750
	46% - 1500	20% - 1500
	46% - 1500	34% - 1250
	22% - 1250	8% - 1000
Metanol	46% - 2500	10% - 2500
	54% - 2250	66% - 2250
		24% - 2000

Tabela 12 - Amostras clínicas de *C. albicans* e respectivos valores de CIM (%) nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de *Tabebuia avellanedae*

Extratos	CIMs (%) de extratos de <i>Tabebuia avellanedae</i> (µg/ml)	
	Crianças (n = 50)	Adultos (n = 50)
Diclorometano	60% - 1750	78% - 2000
	28% - 2000	10% - 2250
	12% - 1500	10% - 1750
		2% - 1500
Metanol	80% - 2250	84% - 2250
	20% - 2000	16% - 2000

Na tabela 13 estão expostos os resultados obtidos com os extratos diclorometânico e metanólico de *Casearia sylvestris* quando testados em amostras clínicas. Em relação aos testes realizados com o extrato metanólico, os valores de CIMs obtidos foram sempre superiores a 2500 µg/ml. O extrato diclorometânico quando testado em amostras provenientes de crianças demonstrou moderada atividade inibitória em 92% das amostras e fraca atividade em 8% delas. Em relação aos testes com amostras de adultos 4% dos valores de CIM (1500 µg / mL) demonstraram moderada atividade, o restante, 96% demonstraram fraca atividade inibitória (CIM > 1600 µg / mL).

O extrato metanólico de *Arctium lappa* demonstrou ser pouco ativo quando testado em amostras clínicas de *C. albicans*, com CIMs superiores a 2000 µg/ml. Os valores das CIMs do extrato diclorometânico quando testado em amostras clínicas variaram bastante (Tabela 14). Em 38% e 90% das amostras de crianças e adultos respectivamente o extrato apresentou moderada atividade inibitória e em relação às demais amostras a atividade inibitória foi fraca.

Na tabela 15, estão expostos os resultados de CIMs do extrato bruto de *Arrabidaea chica* obtido pela extração com metanol e testados em amostras clínicas de *Candida albicans* de crianças e adultos. O extrato metanólico inibiu 26% dos isolados de crianças com CIM de 1000 µg / mL, 50% com CIM de 750 µg / mL, 20% com CIM de 500 µg / mL e 4% com CIM de 250 µg / mL. Em relação as amostras clínicas de adultos o mesmo extrato inibiu 4% das amostras de *Candida albicans* com CIM de 1750 µg / mL, 24% com CIM de 1500 µg / mL 48% com CIM de 1250 µg / mL e 24% com CIM de 1000 µg / mL. O extrato diclorometânico testado nas mesmas amostras apresentou resultados de CIM sempre ≤ 2500 µg / mL (Tabela 15).

Tabela 13 - Amostras clínicas de *C. albicans* e respectivos valores de CIM (%) nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de *C. sylvestrís*

Extratos	CIMs (%) de extratos de <i>Casearia sylvestrís</i> (µg/ml)	
	Crianças (n = 50)	Adultos (n = 50)
	Diclorometano	8% - 1750 54% - 1500 30% - 1250 8% - 1000
Metanol	100% - 2500	100% - 2500

Tabela 14 - Amostras clínicas de *C. albicans* e respectivos valores de CIM em % nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de *A. lappa*

Extratos	CIMs (%) de extratos de <i>Arctium lappa</i> (µg/ml)	
	Crianças (n = 50)	Adultos (n = 50)
	Diclorometano	18% - 2000 44% - 1750 28% - 1500 8% - 1250 2% - 1000
Metanol	70% - 2250 30% - 2000	22% - 2500 74% - 2250 4% - 2000

Tabela 15 - Amostras clínicas de *C. albicans* e respectivos valores de CIM em % nos testes com extratos diclorometânico e metanólico de *A. chica*

Extratos	CIMs (%) de extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (µg/ml).	
	Crianças (n = 50)	Adultos (n = 50)
Diclorometano	82% - 2500 µg-ml	100% - 2500 µg-ml
	18% - 2250 µg-ml	
Metanol	26% - 1000 µg-ml	4% - 1750 µg-ml
	50% - 750 µg-ml	24% - 1500 µg-ml
	20% - 500 µg-ml	48% - 1250 µg-ml
	4% - 250 µg-ml	24% - 1000 µg-ml

As amostras clínicas isoladas de crianças saudáveis (n=50) e as amostras clínicas isoladas de pacientes com doença periodontal (n=50) foram avaliadas em relação a susceptibilidade ao antifúngico fluconazol. A maioria dos isolados de crianças e adultos demonstraram sensibilidade com 75% e 69% de inibição respectivamente. Foram classificados como SDD (susceptibilidade Dose Dependente) 21% das amostras de crianças e 18 % de adultos. Apresentaram resistência frente ao fluconazol 4% e 13% das amostras de crianças e adultos respectivamente. Ao avaliar as amostras que se demonstraram resistentes ao fluconazol em relação a susceptibilidade aos extratos vegetais, todas apresentaram CIMs superiores a 2250 µg / mL representando uma fraca inibição em relação a todos os extratos (diclorometânico e metanólico) testados (Figura 9).

As amostras clínicas isoladas de crianças saudáveis (n=50) e as amostras clínicas isoladas de pacientes com doença periodontal (n=50) também foram avaliadas em relação a susceptibilidade a Anfotericina B. A maioria dos isolados de crianças e adultos demonstraram sensibilidade com 92% e 89% de inibição

respectivamente. Apresentaram resistência 8% das amostras isoladas de crianças e 11% das amostras isoladas de adultos com doença periodontal. Ao avaliar as amostras que se demonstraram resistentes a Anfotericina B, todas apresentaram CIMs superiores a 2250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ representando uma fraca inibição de todos os extratos em relação as amostras resistentes a Anfotericina B (Figura 10).

Nos testes realizados para verificar o efeito dos extratos vegetais na inibição da atividade proteolítica de proteases de *C. albicans*, o extrato diclorometanico se destacou em relação ao extrato metanólico de *Rosmarinus officinalis*. Na Figura 11, observa-se que a melhor inibição ocorreu com os extratos a concentração de 2,5 mg / mL. No entanto, a máxima atividade inibitória não atingiu 16% para o extrato diclorometanico que foi o mais ativo.

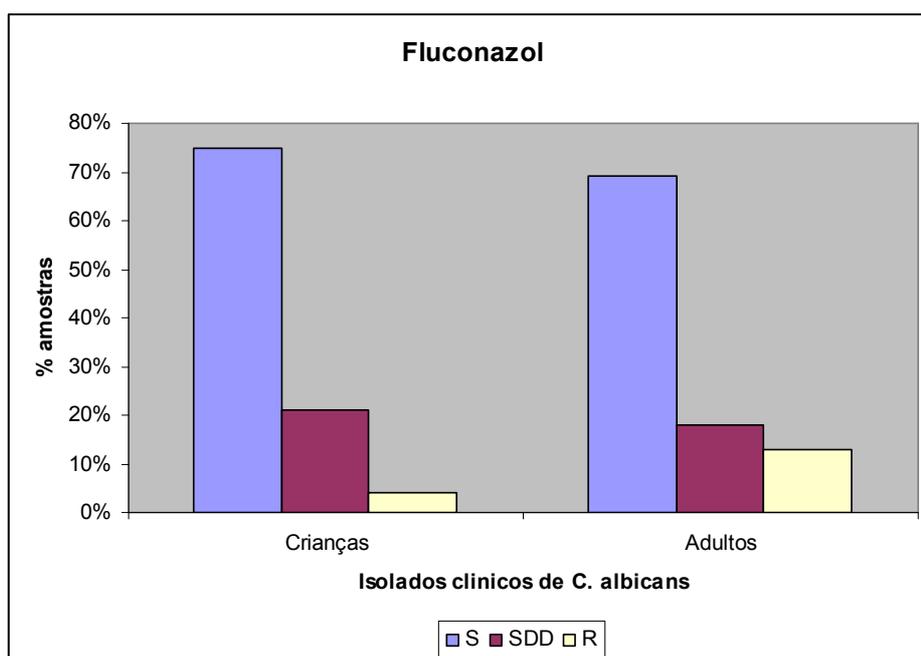


Figura 9 - Amostras clínicas de crianças (n=50) e adultos (n=50) e CIMs do Fluconazol. S - Sensível; SDS – Susceptibilidade dose dependente; R – resistente.

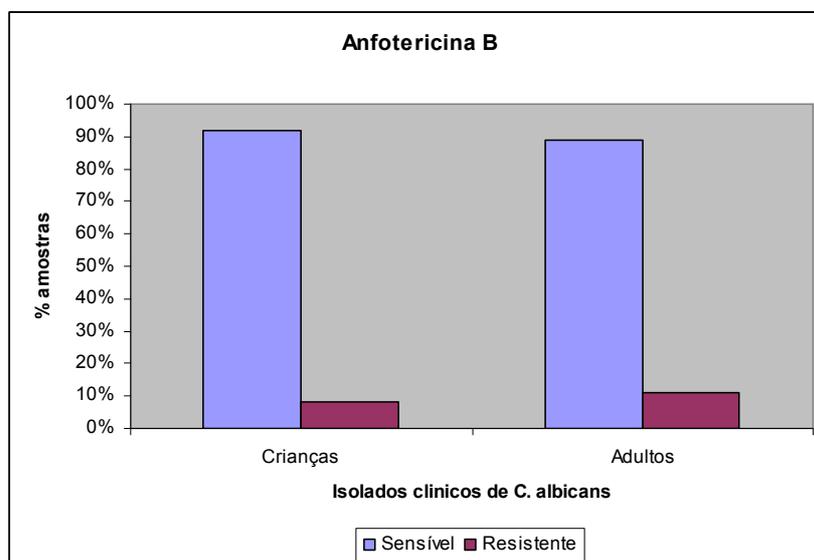


Figura 10 - Amostras clinicas de crianças (n=50) e adultos (n=50) e CIMs em relação a Anfotericina B. S - Sensível; R - resistente.

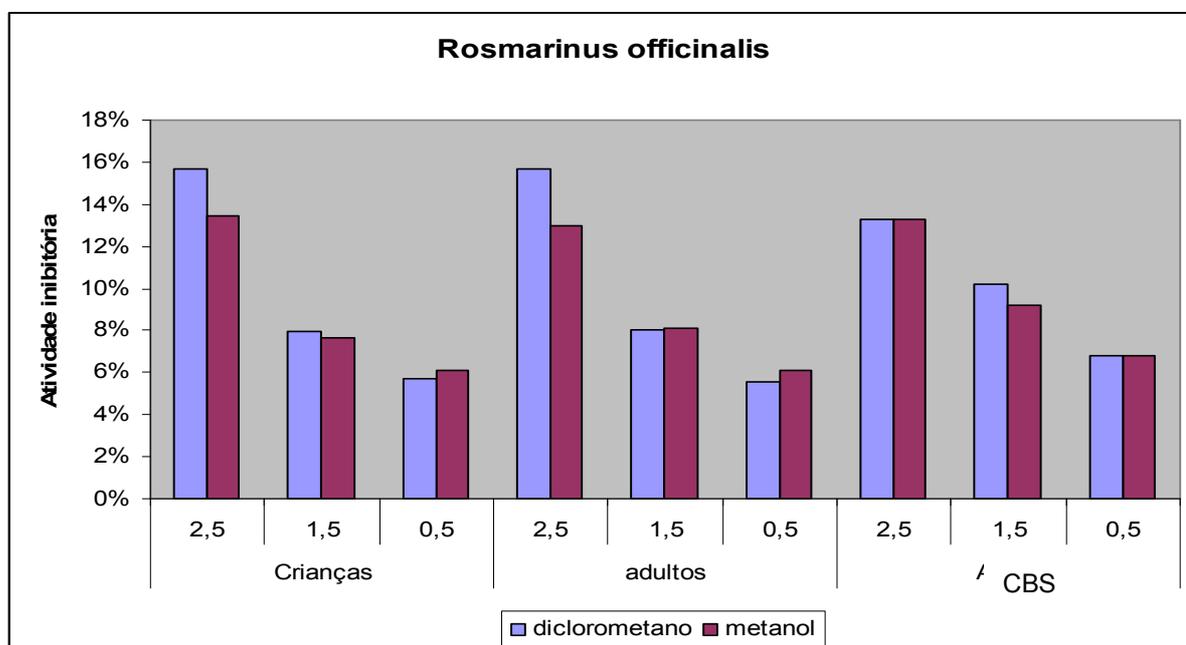


Figura 11 - Inibição das proteinases de *C. albicans* (%) pelos extratos diclorometânico e metanólico de *Rosmarinus officinalis*. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL.

O maior índice de atividade inibitória dos extratos diclorometânico e metanólico de *Mentha piperita* foi a concentração de 2,5 mg / mL. Os dois extratos apresentaram diferenças pequenas em relação à inibição, sendo o extrato diclorometânico o mais efetivo (Figura 12).

O extrato diclorometânico de *Tabebuia avellanedae* foi o mais ativo em relação a atividade inibitória das proteinases de *Candida albicans*. A melhor concentração inibitória ocorreu em testes realizados com 2,5 mg / mL. O extrato metanólico também inibiu a atividade proteolítica, porém foi menos eficiente (Figura 13).

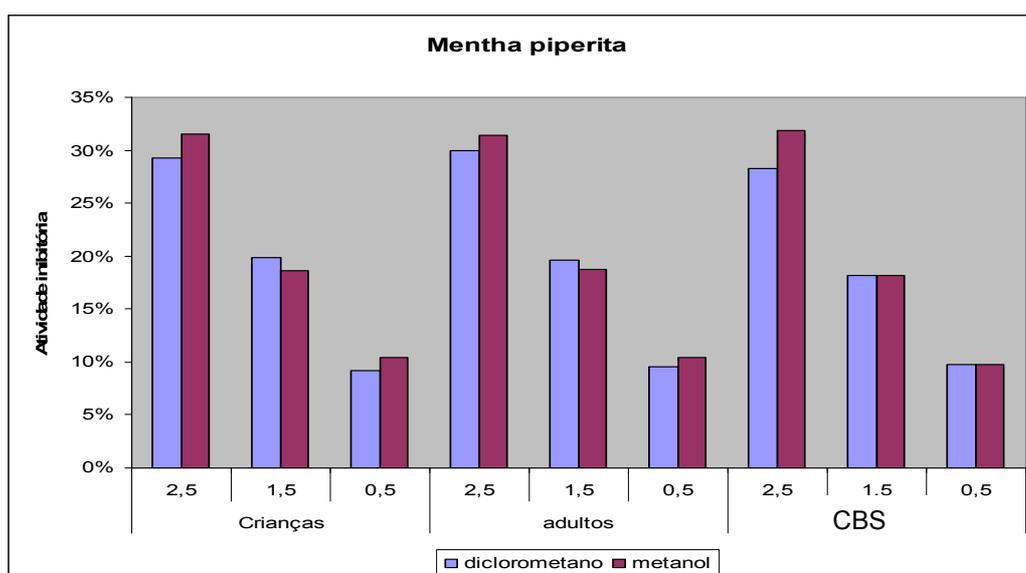


Figura 12 - Inibição das proteinases de *C. albicans* (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de *Mentha piperita*. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

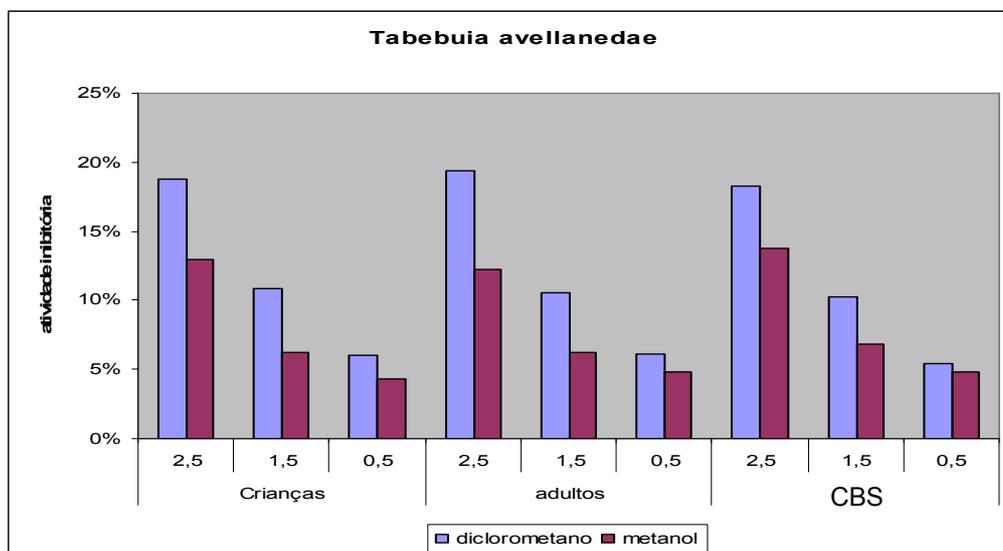


Figura 13 - Inibição das proteinases de *C. albicans* (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de *Tabebuia avellaneda*. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

A figura 14 demonstra a atividade inibitória dos extratos obtidos a partir da *Arrabidaea chica*. A média da inibição obtida com o extrato diclorometânico foi superior a média de degradação obtida com o extrato metanólico. A concentração testada que melhor demonstrou atividade inibitória foi de 2,5 mg /mL. Em proteinases obtidas de amostras clínicas de *C. albicans*, a média de inibição ficou entre 30% e 35%. O extrato metanólico foi pouco efetivo (Figura 14).

Tanto o extrato diclorometânico como o metanólico de *Casearia sylvestris* apresentaram índices de inibição da atividade proteolítica semelhantes, porém o extrato metanólico demonstrou ser um pouco mais eficiente em relação a inibição da atividade proteolítica. A diferença na média de degradação da protease obtida de amostras de *C. albicans* pelo extrato diclorometânico e pelo metanólico foi sutil. A melhor concentração em relação a inibição da atividade proteolítica foi 2,5 mg /mL. Ambos extratos inibiram em média 20% da atividade proteolítica (Figura 15).

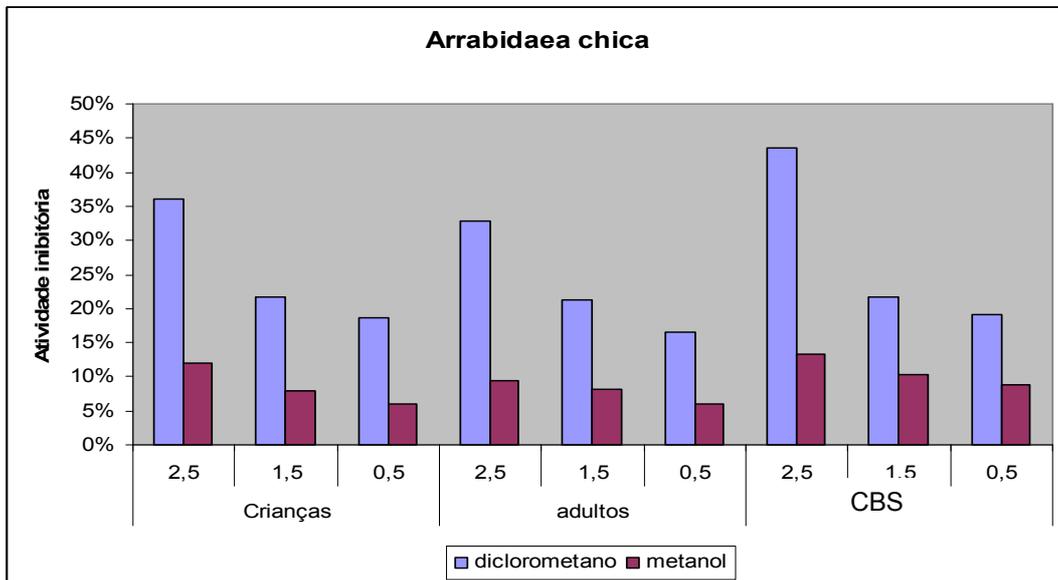


Figura 14 - Inibição das proteinases de *C. albicans* (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de *Arrabidaea chica*. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

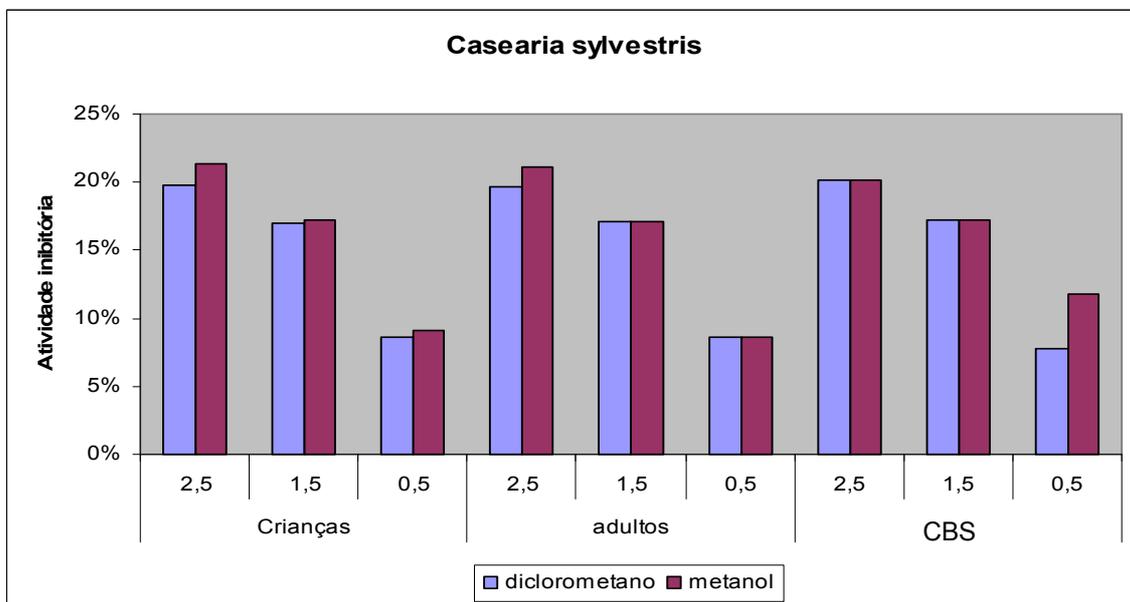


Figura 15 - Inibição das proteinases de *C. albicans* (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de *Casearia sylvestris*. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

Os extratos diclorometânico e metanólico de *Arctium lappa* mostraram pouco eficientes em relação a inibição da atividade proteolítica de *C. albicans*. O extrato diclorometânico demonstrou uma sutil diferença em relação ao extrato metanólico, demonstrando maior efetividade (Figura 16).

Em relação a atividade proteolítica pôde-se observar inibição apartir de todos os extratos (diclorometânico e metanólico) das diferentes plantas analisadas Uma vez que todos os extratos foram testados em diferentes concentrações (2,5 mg / mL, 1,5 mg / mL e 0,5 mg / mL), pequenas variações em relação a inibição da atividade proteolítica das proteinases de *C. albicans* (adultos e crianças) foram encontradas. As variações ocorreram em relação aos diferentes extratos, assim como em relação as diferentes concentrações.

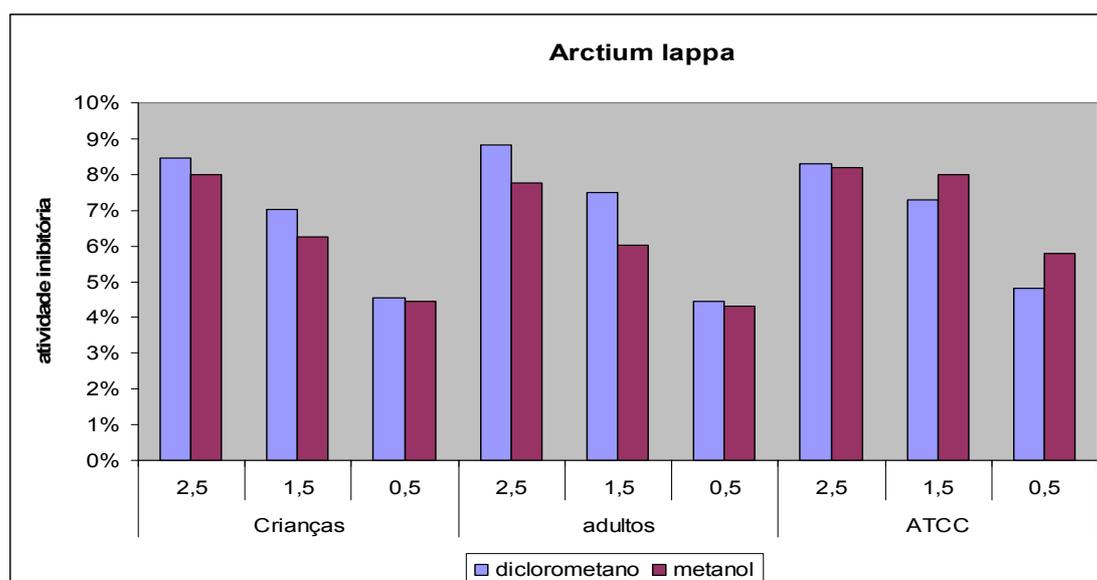


Figura 16 - Inibição das proteinases de *C. albicans* (%) dos extratos diclorometânico e metanólico de *Arctium lappa*. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

A figura 17 exibe a porcentagem de atividade inibitória em relação a todos os extratos vegetais (diclorometânico e metanólico) em relação às proteinases obtidas apartir de isolados clínicos de crianças. A figura 18 expoe os mesmos resultados em relação às amostras clínicas de adultos.

A melhor concentração inibitória da atividade proteolítica para todos os extratos testados foi a de 2,5 mg / mL, nas demais concentrações também houve inibição em relação a tividade proteolítica, porem menor quando comparada a concentração inicial. De todos os extratos testados (diclorometânicos e metanólicos) os que melhor inibiram a atividade proteolitica das proteinases de *C. albicans* foram, na ordem: Extrato diclorometânico de *A. chica*; Extrato metanólico de *Mentha piperita*; Extrato diclorometânico de *Mentha piperita*; Extrato metanolico de *Casearia sylvestris*; Extrato diclorometânico de *Casearia sylvestris*; Extrato diclorometânico de *Tabebuia avellanedae*; Extrato diclorometânico e posteriormente o metanólico de *Rosmarinus officinallis*; e na seqüência extrato metanólico de *Tabebuia avellanedae*; Extrato metanólico de *Arrabidaea chica* e por ultimo o que apresentou mais fraca atividade inibitória das Aspartil Proteinases Secretadas (SAPs) foram os extratos diclorometanico e metanólico de *Arctim lappa* (Figura 19).

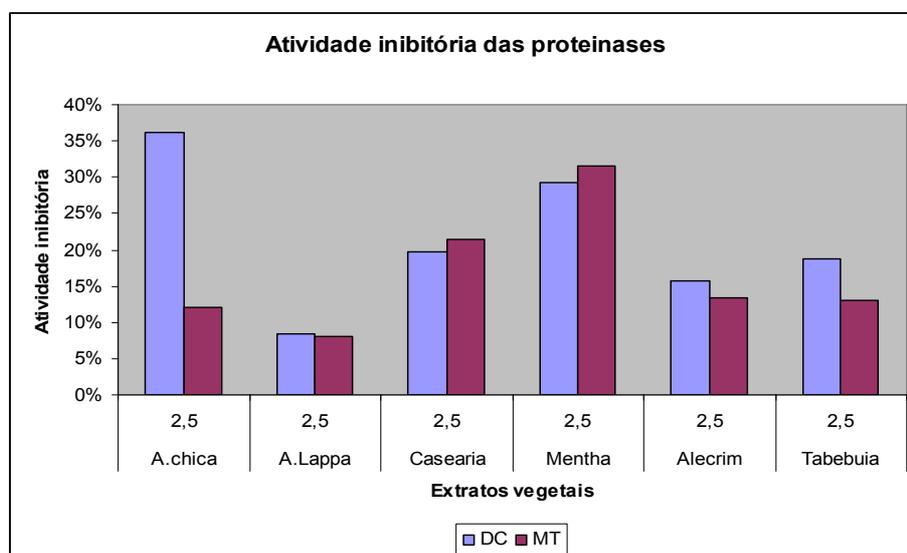


Figura 17 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* dos obtidas apartir de amostras clínicas de crianças pelos extratos (diclorometânico e metanólico) de todas as plantas analisadas. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

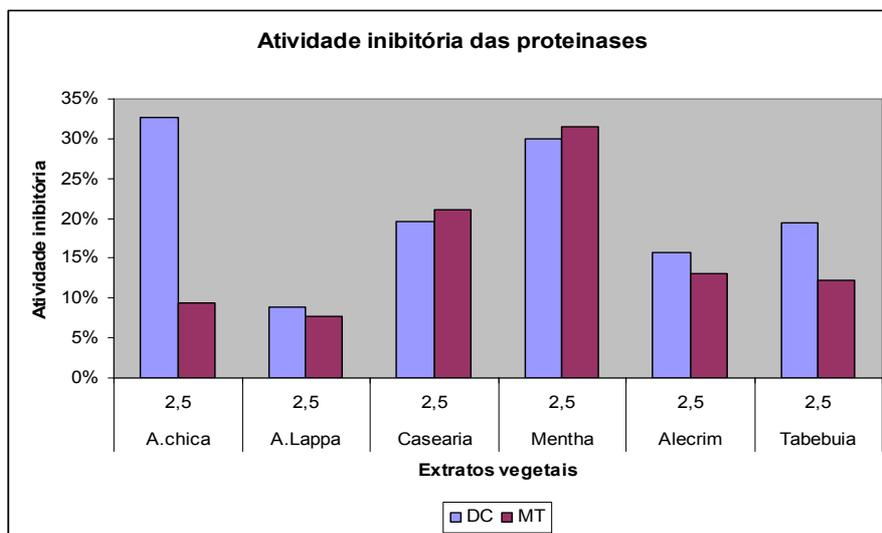


Figura 18 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* obtidas a partir de amostras clínicas de adultos pelos extratos (diclorometanico e metanólico) de todas as plantas analisadas. Crianças (n=10); Adultos (n=10). Concentração dos extratos em mg/mL

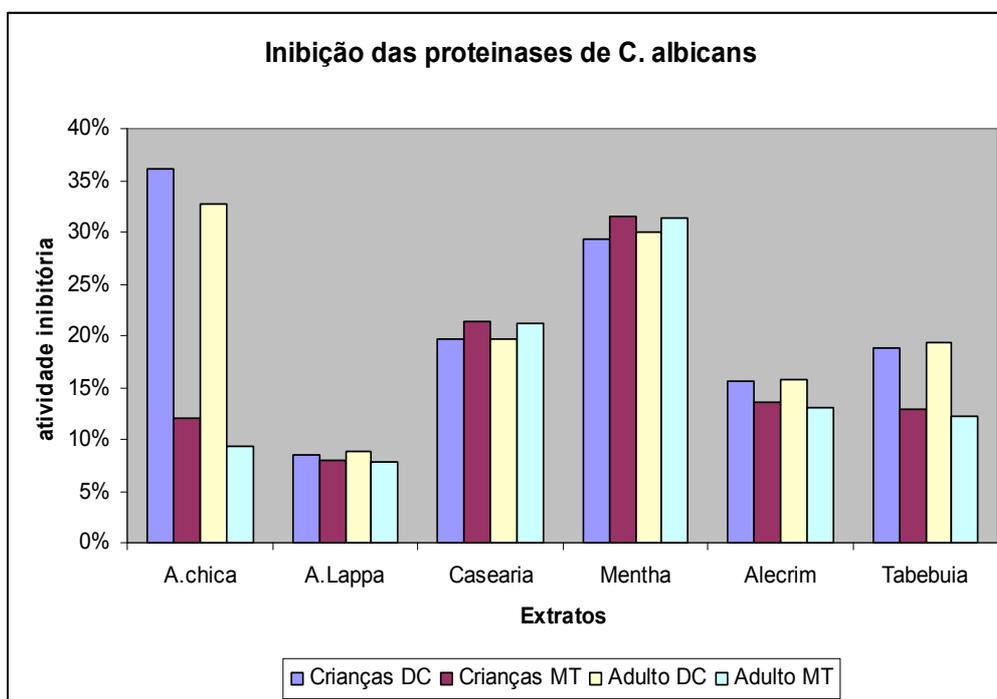


Figura 19 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* obtidas a partir de amostras clínicas de adultos pelos extratos (diclorometanico e metanólico) de todas as plantas analisadas. DC - Extrato diclorometanico; MT - Extrato metanólico.

Uma das drogas controle utilizadas neste experimento foi a droga inibidora de protease, Pepstatina A. Testada em diferentes concentrações em uma cepa padrão de *C. albicans* (CBS – 562) e nas amostras clínicas de crianças e adultos pudemos observar que a melhor concentração da atividade inibitória das proteinases de *Candida* foram obtidas a uma concentração de 100 µg / mL, a qual inibiu a atividade proteolítica das cepas de crianças e adultos em 92% e 90% respectivamente (média). A cepa padrão CBS – 562, teve sua atividade proteolítica inibida em 94% com a Pepstatina A. As demais concentrações testadas, 25 µg / mL e 50 µg / mL, também demonstraram atividade inibitória, porém, em índices inferiores quando comparadas a concentração de 100 µg / mL (Tabela 16).

Tabela 16 - Droga controle (Pepstatina A – inibidor de protease) testada em diferentes concentrações nas amostras clínicas de *C. albicans*

Controle +	Sem nenhuma droga		
Controle -	Apenas diluente da droga		
	Concentração:	Concentração:	Concentração:
	25 µg / mL	50 µg / mL	100 µg / mL
Pepstatina A	30%	42,5%	92%
	27,5%	43%	90%
	32%	42%	94%

Outras drogas caracterizadas como inibidoras de proteases (IPs) foram avaliadas. O Amprenavir a 10 mg / mL inibiu a atividade proteolítica em 86%, 90% e 88% das proteinases provenientes de amostras clínicas de crianças, adultos e da cepa padrão CBS-562 respectivamente. Também foi observada inibição das proteinases nas concentrações 5 mg / mL e 2,5 mg / mL porém, em quantidades inferiores em relação a maior concentração (10 mg / mL). O Ritonavir também apresentou inibição superior a concentração de 10 mg / mL. Proteinases provenientes de amostras clínicas de crianças e adultos foram inibidas em 79% e

81% respectivamente e a cepa padrão CBS-562 teve 79% da atividade proteolítica inibida. As demais concentrações dessa droga também apresentaram atividade inibitória em relação as proteinases de *C. albicans*, porém, menor em relação a concentração de 10 mg / mL (Figura 20).

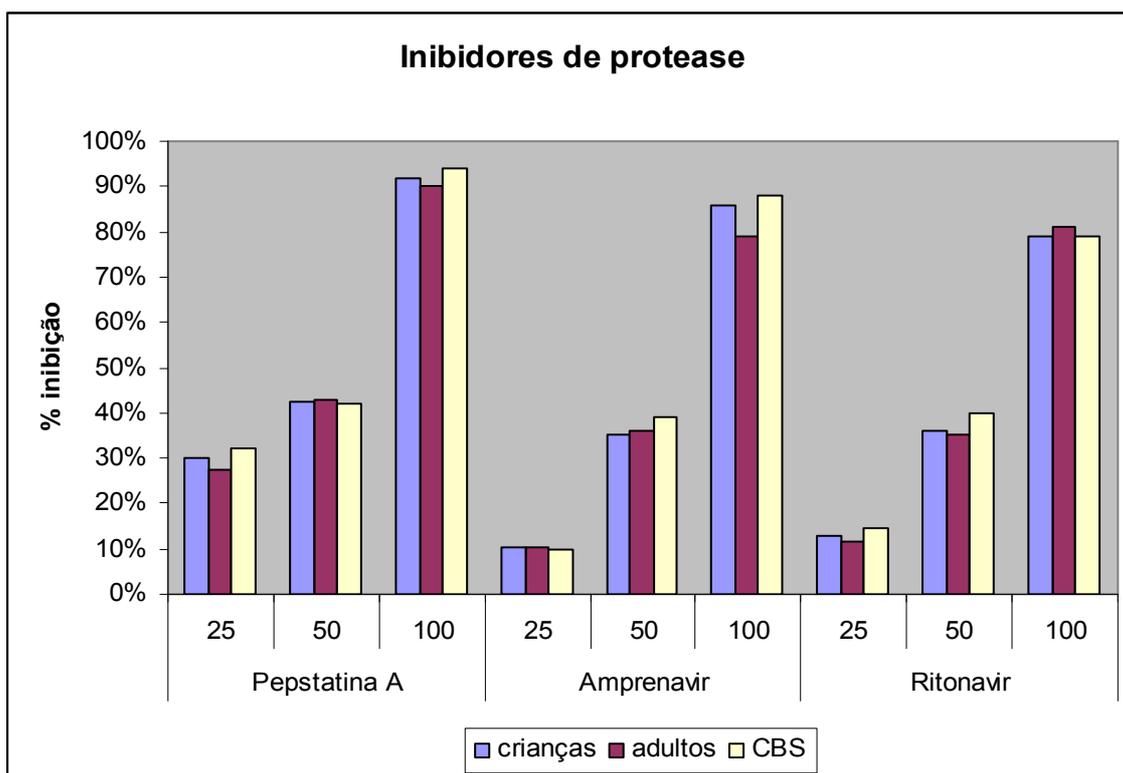


Figura 20 - Atividade inibitória (%) das proteinases de *C. albicans* provenientes de amostras clínicas de crianças e adultos e da cepa padrão CBS 562 obtidas com os inibidores de proteases (IPs) Amprenavir, Ritonavir e Pepstatina A. As concentrações em mg / mL.

6 Discussão

Candida spp são habitantes comuns da cavidade oral tanto de adultos como de crianças (Darwazeh & Al-Bashir, 1995; Hannula *et al.*, 1999). É uma levedura capaz de residir em equilíbrio com a microbiota comensal de hospedeiros saudáveis e assintomáticos (Hannula, 2000). Entretanto, apenas pequenas alterações nesse estado podem modificar o comportamento dessa espécie, que passa a manifestar seu potencial de virulência, e assim, de comensal inofensivo tornar-se um patógeno agressivo (Hube & Naglik, 2001).

Para auxiliar na invasão dos tecidos do hospedeiro, as células microbianas possuem um conjunto de enzimas hidrolíticas que lesam ou destroem os constituintes das membranas das células alvo levando a uma disfunção e ou destruição física (Salyes & Witt, 1994). As membranas celulares são constituídas de lipídeos e proteínas que podem servir como um receptor para enzimas microbianas. Fungos patogênicos como *Candida albicans*, secretam enzimas que são consideradas essenciais para sua patogenicidade, como proteinases (Hube *et al.*, 1998), que hidrolisam ligações peptídicas (Ibrahim *et al.*, 1995).

A atividade enzimática das proteinases produzida por *C. albicans*, também é apontada como um indicador de cepas virulentas. Esse grupo de enzimas exhibe ampla inespecificidade por substratos e são capazes de degradar muitas proteínas humanas encontradas nos sítios das lesões, como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucinas e IgA secretora (Rüchel, 1984; Colina *et al.*, 1996; Hube, 1996). A importância das proteinases secretadas como fatores de virulência de *C. albicans* têm sido amplamente investigada em modelos de candidíase (Hube, 1996; Sanglard *et al.*, 1997).

A produção de proteinases por cepas de *C. albicans* pode também variar bastante. No presente estudo, ao avaliar a atividade proteolítica de cepas de *C.*

albicans provenientes de dois grupos de voluntários crianças saudáveis (n=100) e adultos com doença periodontal (n=100) pôde se verificar que a maioria das cepas de *Candida albicans* são produtoras ativas de proteinases visto que 94% e 95% das cepas de crianças saudáveis e adultos com doença periodontal respectivamente foram positivas em relação a produção dessa enzima. Esses dados se aproximam daqueles obtidos por Penha *et al.*, 2000 que analisando amostras de *C. albicans* da cavidade oral, verificaram que 100% dessas cepas eram produtoras de proteinases. Os diferentes padrões de produção de proteinases por cepas de *C. albicans* provenientes de indivíduos pertencentes aos dois grupos cárie ativos e livres de cárie demonstraram que 89,4% e 98% das cepas possuem atividade enzimática positiva respectivamente (Mardegan *et al.*, 2006). Ainda Ollert *et al.*, 1995 analisando amostras da cavidade oral de voluntários HIV positivos e negativos, constataram que todos os isolados foram proteolíticos, sendo que a atividade secretora (valores de PZ) revelou ainda que, isolados provenientes de HIV positivos eram mais proteolíticos em relação ao grupo controle.

Assim a possibilidade de isolados de *Candida* spp passarem por alterações fenotípicas e fisiológicas, e secretarem enzimas virulentas, que contribuem para sua patogenicidade e podem promover a esse organismo eucarioto, um grande potencial de adaptação. Mudanças fenotípicas podem contribuir para o sucesso de *Candida* spp em se transformar de comensal para patogênica, por gerarem uma diversidade necessária para adaptar-se aos diferentes ambientes e mecanismos de defesa do hospedeiro (Ray *et al.*, 1991). Na verdade a patogenicidade de *C. albicans*, é um processo complexo, envolvendo diferentes estágios, aderência, invasão, fagocitose, colonização, danos às células do hospedeiro e outros. Todos os diferentes fatores, presentes nos tecidos ou órgãos, assim como a competição com outros microrganismos do mesmo nicho, pode influenciar a colonização, sobrevivência e o estado como comensal ou patogênico dessa levedura,

induzindo a um aumento ou diminuição do perfil enzimático desses microrganismos (Hube & Naglik, 2001)

Nos últimos vinte anos, a frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente em indivíduos imunocomprometidos. Entre estas, a mais comum é a candidíase, seguida da aspergilose, que apresenta maior mortalidade (Ollert *et al.*, 1995). Paralelamente ao aumento dessas infecções vem ocorrendo a introdução no mercado de novos agentes antifúngicos, e o isolamento de cepas resistentes a essas drogas (Colombo *et al.*, 1995).

Como podemos constatar, então, os medicamentos antifúngicos para infecções sistêmicas utilizados atualmente não satisfazem a necessidade médica completamente, devido a problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos agentes disponíveis. Considerando-se o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o conseqüente aumento na mortalidade populacional relacionada, percebemos a necessidade da escolha apropriada do antifúngico; além de profilaxia eficaz e desenvolvimento de medicamentos que aumentem a capacidade de resposta dos organismos imunocomprometidos. Atualmente a busca de novas drogas que atuem de modo seletivo, que causem a inibição de um processo de virulência do patógeno que não existam no hospedeiro, ou seja, suficientemente diferentes, para que seu metabolismo seja pouco afetado.

O emprego de recursos naturais no tratamento de distintas patologias tem ressurgido com ênfase. Nas últimas décadas, têm-se verificado um aumento na demanda por plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico (Mahady, 2001; Givon *et al.*, 2004). Daí a necessidade de se inspirar novamente na natureza e de se utilizar substâncias de defesa inata das plantas medicinais – os medicamentos naturais. Para isso há necessidade de extração desses compostos vegetais. O termo extração significa retirar, de maneira mais seletiva e

completa possível, as substâncias ou fração ativa contida no vegetal, utilizando-se para isso, um líquido ou uma mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (Simões *et al.*, 2005). É graças a essa seletividade que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se assim uma extração fracionada em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente (Simões *et al.*, 2005). Por isso, nesse estudo utilizou-se inicialmente, do diclorometano, capaz de extrair substâncias lipofílicas, óleos fixos e ceras, seguindo da extração com etanol, de maior polaridade e capaz de retirar saponinas e taninos.

Não existe um consenso em relação ao nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados aos antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos antibióticos enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibição superiores (Duarte *et al.*, 2005). Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para material vegetal com base nos resultados de CIM, considerando como forte inibição CIM $\leq 500 \mu\text{g} / \text{mL}$, moderada inibição, CIM ≥ 600 e $\leq 1500 \mu\text{g} / \text{mL}$ e fraca inibição CIM acima de $1600 \mu\text{g} / \text{mL}$. Avaliados segundo Aligianis *et al.*, 2001, os extratos vegetais utilizados neste estudo demonstraram atividade em uma ou mais espécies de *Candida*.

Os testes realizados para determinar o potencial antifúngico dos extratos (diclorometânico e metanólico) de *Rosmarinus officinalis* demonstraram pouca atividade inibitória em relação às cepas padrão de *Cândida* spp assim como em relação as amostras clínicas de *C. albicans* dos dois grupos de isolados testados.

O extrato diclorometânico obtido dessa planta demonstrou baixa atividade inibitória em relação a todas as amostras testadas, já o extrato metanólico foi considerado inativo. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Dulger & Gonuz (2004) que verificaram resistência de cepas de *C. albicans* frente aos mesmos tipos de extratos testados (diclorometânico e metanólico). Bara & Vanetti (1998) que trabalharam com extratos hidroalcoólicos de 16 espécies vegetais para avaliação da atividade antimicrobiana indicou que *R. officinalis* foi de todos os extratos testados, o menos ativo. A maioria dos trabalhos de pesquisa realizados com *Rosmarinus officinalis*, analisa a atividade do óleo essencial dessa espécie, poucos trabalhos relatam o uso de extratos hidroalcoólicos.

Trabalhando com óleo essencial de *R. officinalis*, Lima *et al.* (2006) avaliaram a atividade antifúngica em várias cepas de *Candida* spp pelo teste de difusão em agar e observaram atividade inibitória em cepas padrão de *C. albicans* (ATCC-76615), *C. guilliermondii* (LM-6T), *C. krusei* (FCF-281) e *C. parapsilosis* (MD-6), porém a medida dos halos de inibição utilizadas para avaliar o potencial inibitório desse óleo, fez com que o mesmo fosse considerado de baixa atividade anti-candida. Da mesma forma estudos *in vitro* realizados por Panizzi *et al.* (1993) também demonstraram fraca atividade inibitória do óleo essencial em relação à *Sacharomyces cerevisiae* e *C. albicans*. Relatos de trabalhos com outros microrganismos (bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos filamentosos) também indicam *Rosmarinus officinalis* como pouco ativo ou sem atividade inibitória (Suhr & Nielsen 2003; Lopes *et al.*, 2005; Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Com o propósito de avaliar associação de extratos vegetais com antibióticos frequentemente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, um grupo de pesquisadores observou a ocorrência de sinergismo, possibilitando assim que antibióticos individualmente inativos apresentassem ação sobre algumas bactérias quando associado ao extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Nascimento *et al.*, 2000). Nesse mesmo trabalho, os autores avaliaram também a atividade do

extrato etanólico desse vegetal quando utilizado isoladamente e nenhuma atividade foi evidenciada.

Em outro estudo realizado por Cowan (1999), trabalhando com óleo essencial, foi demonstrada a atividade antimicrobiana de *R. officinalis* em relação a diversas bactérias, porém, os testes não foram realizados em fungos. O mesmo autor relata que a atividade antimicrobiana de várias espécies vegetais está relacionada as classes de substâncias químicas presentes nos extratos obtidos com diferentes solventes (água destilada, etanol e metanol). Segundo Cowan (1999), a atividade biológica de *Rosmarinus officinalis* é atribuída aos terpenóides. Pela análise farmacognóstica dos compostos presentes nessa espécie vários trabalhos relatam a presença de taninos, flavonóides e alguns ácidos fenólicos (Matos, 2000; Lorenzi & Matos, 2002; Cordeiro *et al.*, 2006). Um estudo de sazonalidade com a espécie *Rosmarinus officinalis* indica que a síntese de terpenos está diretamente relacionada com a temperatura ambiente em que é cultivado o vegetal e ainda verificaram que a máxima concentração desses compostos foi na época de inverno e a mínima na época de verão (Llusia *et al.*, 2006). Quando os extratos de *Rosmarinus officinalis* foram testados para avaliar o potencial inibitório da atividade proteolítica das proteinases de *C. albicans*, os resultados demonstraram fraca atividade inibitória mesmo em altas doses do extrato.

Vários fatores contribuem para as divergências nos resultados obtidos com extatos vegetais, dentre os quais podemos citar: os diferentes meios de cultura utilizados nos testes, condições determinadas para estes, a pureza do material utilizado para extração, a eficiência no processo extrativo, assim como as diferentes formas de extração (Scott Luper, 1998). Além disso, vários estudos relatam que os componentes químicos presentes na planta diferem em relação a parte do vegetal utilizada (folhas, cerne, raiz), em relação a maturidade da planta, além da variabilidade genética da espécie, e das condições do processamento do material vegetal (Gherman *et al.*, 2000; Pino *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003).

Os componentes químicos presentes na planta variam em relação a parte testada, em relação a maturidade da planta, variedade, região geográfica, e condições de processamento (Xu *et al.*, 2003; Pino *et al.*, 2002; Gherman *et al.*, 2000)

Ao avaliar os extratos (diclorometânico e metanólico) de *Tabebuia avellanedae* para determinação do potencial antifúngico, foi possível observar que o extrato metanólico não foi efetivo em nenhuma espécie de *Candida*, ao contrario do extrato diclorometanico que inibiu o crescimento das cepas padrão de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* com valores de CIM entre 1250 µg/ml e 1500 µg/ml, sendo considerado de moderada atividade em relação às mesmas. Quando avaliados em amostras clínicas de *C. albicans* de crianças e adultos apenas 14% do total de amostras foram inibidas com CIM de 1500 µg / mL. Em 86% das amostras os valores de CIM foram considerados elevados.

Nossos dados estão de acordo com a literatura onde Portillo *et al.* (2001) ao avaliar extratos obtidos apartir de 14 plantas verificaram que a *Tabebuia avellanedae* foi uma das mais ativas em relação a maioria dos fungos testados (*A. fumigatus*, *C. neoformans*, *S. cerevisiae* e *C. albicans*), sendo que extrato diclorometanico foi o que apresentou melhores resultados.

As atividades biológicas referidas a *Tabebuia avellanedae*, inclusive a atividade antimicrobiana são citadas na literatura como sendo provavelmente devido à saponinas, flavonóides, cumarinas e antibióticos naturais como o lapachol e seus derivados (Panizza, 1997; Falkenberg, 1999). O lapachol é uma naftoquinona natural. Em estudos farmacológicos as quinonas mostram variadas biodinamicidades destacando-se entre muitas propriedades antimicrobicidas, antivirais, antifúngicas, antitumorais, processos nos quais atuam de diferentes formas (Silva *et al.*, 2003). Uma atividade marcante dessa substância descoberta recentemente é a inibição do complexo das topoisomerases, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (Silva *et al.*, 2003). O lapachol também

possui a capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio que podem danificar componentes celulares importantes. Estudos realizados indicam que o estresse oxidativo induzido pelo lapachol ocorre em nível da enzima P450 redutase. Nesse processo as espécies reativas do oxigênio promovem a cisão do DNA (Kumagai *et al.*, 1997). Este tipo de mecanismo de ação é importante, pois alguns microrganismos patogênicos são muito mais sensíveis ao estresse oxidativo que os humanos hospedeiros (Molina *et al.*, 1996). Além disso, atividades farmacológicas como antifúngica já foram atribuídas ao lapachol e á seus derivados semi-sintéticos (Garnier *et al.*, 1996). Koyama *et al.* (2000) mostraram que a casca de ipê roxo tem sido muito utilizada popularmente por sua ação antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana e antiinflamatória.

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos diclorometanico e metanólico de *Casearia sylvestris* demonstrou pouca ou nenhuma atividade do extrato metanólico em relação a todas as cepas testadas. Já o extrato diclorometanico inibiu o crescimento de cepas padrão de *C. albicans* e *C. krusei* com CIMs de 1000 µg / mL, sendo considerado como um extrato de moderada atividade em relação a essas cepas. Quando testado em amostras clinicas de crianças e adultos os resultados demonstraram CIMs que representaram entre moderada e fraca atividade inibitória.

Em um trabalho de pesquisa realizado por Arantes *et al.* (2004), visando elaborar um dentifrício a base de *Casearia sylvestris*, os autores verificaram atividade antimicrobiana em relação a *Candida albicans*. Em um outro momento também já foi relatada sua atividade antifúngica, porém em relação a fungos filamentosos (Bolzani *et al.*, 1999). Um fracionamento feito com o extrato metanólico de *Casearia sylvestris* permitiu o isolamento de três novos diterpenóides clerodano, sendo atribuído aos mesmos importantes bioatividade em relação a células tumorais, como antimicrobiano, inclusive contra fungos filamentosos que já foram determinados em estudos iniciais (Oberlies *et al.*, 2002).

Os extratos de *Arctium lappa* quando avaliados neste trabalho apresentaram fraca atividade antimicrobiana do extrato metanólico em relação as cepas testadas. O extrato diclorometanico demonstrou atividade antifúngica em 38% e 90% das amostras clínicas de *C. albicans* proveniente de crianças e adultos respectivamente com valores de CIM $\leq 1500 \mu\text{g} / \text{ml}$ (sendo considerado de moderada atividade em relação a essas amostras).

Vários trabalhos realizados com essa planta demonstram certa atividade antimicrobiana em relação a essa espécie. Pereira *et al.* (2005) que testaram o extrato hidroalcolico em alguns microrganismos encontrados em infecções endodonticas incluindo *C. albicans*, através do método de difusão em agar verificou que a fase hexanica apresentou atividade contra a maioria deles. Pereira *et al.* (2002) também relataram atividade antimicrobiana do extrato hexânico em microrganismos, incluindo *C. albicans* e indicaram como componentes ativos desse extrato várias substâncias de diferentes polaridades encontradas na fase hexânica.

Em recente experimento realizado por Gentil *et al.* (2006) que testaram a atividade antimicrobiana da fração acetato de etila de *Arctium lappa*, relataram que a mesma possui capacidade de inibir o crescimento microbiano, inclusive o de *C. albicans*. Da mesma forma Perin *et al.*(2002) ao testarem tinturas de *A. lappa* através do teste de difusão em agar mostraram que as mesmas foram efetivas em inibirem o crescimento de bactérias e leveduras, incluindo a espécie *C. albicans*.

Holetz *et al.* (2002) demonstraram que o extrato (fração acetato de etila) de *A. lappa* apresentou atividade inibitória em bactérias Gram positivas e Gram negativas, porém foi relatada a inatividade da fração em relação a *C. albicans*. Porém os CIMs utilizados por este autor foram classificados como elevada atividade (CIMs $\leq 100 \mu\text{g} / \text{mL}$), moderada atividade (CIMs ≥ 100 e ≤ 500), fraca atividade (CIMs $\geq 500 \leq 1000$) e inativos (CIMs ≥ 1000), diferentes dos utilizados como padrão para o presente trabalho de pesquisa.

Os extratos diclorometânico e metanólico de *Arrabidaea chica* também foram avaliados em relação a sua atividade antimicrobiana e os resultados obtidos com o extrato diclorometânico demonstraram baixa efetividade em relação a todos os microrganismos testados. Em relação ao extrato metanólico pudemos observar moderada e forte atividade inibitória em cepas padrão de *Candida* spp e em isolados clínicos de *C. albicans*. Os valores de concentração inibitória mínima obtidos em cepas padrão de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram CIMs \leq 1000 μ g / mL. Nos resultados dos testes de susceptibilidade de amostras clínicas de *C. albicans* isoladas de crianças, 100% foram inibidas com CIMs \leq 1000 μ g / mL e em relação aos isolados clínicos de adultos, pudemos observar que 96% foram inibidos com CIMs entre 1500 μ g / mL e 1000 μ g / mL (moderada atividade inibitória).

Um trabalho realizado por Alcerito *et al.* (2002) com *Arrabidaea brachypoda*, relatam a presença de flavonóides com atividade antifúngica. Nesta planta algumas antocianinas já foram relatadas (Chapman *et al.*, 1927; Takemura *et al.*, 1995; Zorn *et al.*, 2001). As antocianinas são substâncias fenólicas, glicosídeos de antocianidinas, derivados do cátion flavilium (Figueiredo *et al.*, 1996), e suas atividades biológicas já foram bastante relatadas. Nossos resultados sugerem a necessidade de estudos mais detalhados a respeito dessa espécie, tanto para verificar suas atividades antimicrobianas, como para avaliar os compostos responsáveis por suas atividades biológicas.

Os extratos (diclorometânico e metanólico) de *Mentha piperita* apresentaram resultados evidenciando uma maior atividade biológica no extrato diclorometânico que inibiu 62% e 68% dos isolados clínicos de *C. albicans* de adultos e crianças respectivamente com CIMs \leq 1500 μ g / mL. O extrato metanólico demonstrou pouca ou nenhuma atividade em relação às amostras testadas.

A maioria dos estudos realizados com *Mentha piperita*, tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano ou antifúngico do seu óleo essencial. Iscan *et al.* (2002) avaliaram o potencial do óleo essencial dessa espécie em 21 patógenos de plantas e humanos e relataram que o mesmo exerceu apenas moderada atividade em patógenos humanos.

O extrato metanólico e o óleo essencial de *Mentha piperita* também foram avaliados em relação à atividade antifúngica por Duarte *et al.* (2005) que revelaram nenhuma atividade biológica em relação ao extrato metanólico. O óleo essencial, no entanto, apresentou atividade inibitória em espécies de *Candida*. A atividade fungicida do óleo essencial de *Mentha piperita* também foi demonstrada no trabalho de Pattnaik *et al.* (1996) que inibiu *C. albicans* em CIMs de 0,25 – 10 µg / mL.

De acordo com Freitas *et al.* (2004), a produção de metabólitos secundários ocorre em função da interação planta ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos. Esse fato pode esclarecer as divergências nos resultados de extratos da mesma espécie, porém, coletados em diferentes épocas. Além disso, plantas da mesma espécie cultivadas em diferentes localidades normalmente possuem os mesmos componentes mas a porcentagem em que estão presentes pode diferir. Os fatores de ordem nutricional, genética, ambiental também influenciam a síntese de princípios ativos podendo ocorrer variações tanto na qualidade como na quantidade desses componentes químicos (Robbers *et al.*, 1997).

Nossos resultados em relação ao Fluconazol e a Anfotericina B demonstraram que os padrões de suscetibilidade dos isolados de *C. albicans* e *C. não albicans* aos dois antifúngicos testados diferiram consideravelmente. Uma observação importante é que apesar de ter sido utilizado maior número de isolados de *C. albicans* do que de outras espécies no presente estudo, todas as cepas padrão de *Candida não albicans* mostraram suscetibilidade dependente da

concentração (SDC) ao Fluconazol. Isso permite afirmar que é necessária a adequação da dose desta droga a ser utilizada para inibição de tais cepas.

Em relação à Anfotericina B, verificamos que a maior parte dos isolados foram sensíveis, que está de acordo com os resultados encontrados anteriormente por Mariano *et al.* (2002). Considerando a literatura pertinente, constatamos que não existe um padrão usual de comportamento de isolados clínicos em relação à suscetibilidade aos antifúngicos estudados, uma vez que diferentes autores encontraram diferentes resultados neste aspecto. Marra & Camargo (2002), por exemplo, concluíram em seu trabalho, que a eficácia dos dois tipos de drogas foram equivalentes. Muñoz *et al.* (1997) destacaram a ocorrência de resistência cruzada entre os antifúngicos azólicos, fundamentada na presença de mecanismos de ação similares. Isso demonstra padrões diferentes de suscetibilidade das mesmas cepas às drogas testadas (Arikan *et al.*, 1995).

O problema da resistência a drogas convencionais adquiridas pelos microrganismos é crescente e as perspectivas futuras da produção e uso de novas drogas ainda continua incerta. Desta forma, o uso de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana podem ser significativos nos tratamentos terapêuticos (Loguercio *et al.*, 2005). Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais ou igualmente seguros em relação aos já existentes. Nossos resultados permitem sugerir que as substâncias naturais presentes nas plantas constituem perspectiva para a obtenção de antibióticos naturais. Entretanto são necessários estudos para caracterização química, farmacológica e toxicológica dessas substâncias visando garantir o uso racional das plantas medicinais e aromáticas.

Quando os extratos vegetais utilizados neste trabalho foram avaliados em relação a inibição da atividade proteolítica de proteinases de *C. albicans*, pudemos observar que os extratos mais efetivos foram: extratos diclorometânicos de

Arrabidaea chica, *Mentha piperita* e *Casearia sylvestris* e os extratos metanólicos de *Mentha piperita* e *Casearia sylvestris*.

As proteinases são fatores de virulência relevantes em alguns tipos de infecções causadas por *Candida albicans* e que a inibição dessa enzima revela um efeito protetor para o hospedeiro (Bernardis, 2001; Hube & Naglik 2001). Nas últimas décadas tem sido demonstrado um crescente interesse nas medicinas alternativas e nas terapias naturais. A utilização de substâncias naturais no tratamento de diversas patologias é antiga e cresce demasiadamente no presente (Correa *et al.*, 2002). Estudos com agentes inibidores de proteinases tem sido o propósito de novas pesquisas no controle da candidíase (Hoegl *et al.*, 1999) inclusive através do uso de plantas medicinais (Zhizhen *et al.*, 2002).

Estudos recentes demonstraram que *Casearia sylvestris* possui atividade na inibição das proteases presentes em venenos de cobras e abelhas promovendo a neutralização de proteases e fosfolipases (Borges *et al.*, 2000, 2001). Um possível esclarecimento em relação à neutralização das proteases é a ocorrência de agentes quelantes que formam complexos com íons metal (Borges *et al.*, 2001). Conseqüentemente enzimas que dependem do íon metal para sua atividade pode ser inibida frente aos componentes de *Casearia sylvestris* (Borges *et al.*, 2001). Taninos e flavonóides também são capazes de se ligar a íons metal. Além disso os flavonóides apresentam uma alta reatividade química que pode se ligar a polímeros biológicos e habilidade de catalisar transporte de elétrons e estudos já demonstraram inibição de várias enzimas por flavonóides (Havsteen 1983). Taninos e flavonóides estão presentes em *Casearia sylvestris* (Luz *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2000)

Inibidores de protease são pequenas proteínas naturais comumente encontradas em espécies vegetais e estão relacionadas com o sistema de defesa de certas plantas contra insetos patogênicos e microrganismos (Koiwa *et al.*, 1997). Os inibidores de protease (PI) são antagonistas naturais das proteases,

que são pequenas proteínas comumente encontradas na natureza e em outras formas de vida. (Fritz, 2000). A maioria das PIs interagem com suas proteases alvo por fazer contato com sítio catalítico ativo dessa protease, resultando na formação de um complexo inibidor estável, inibindo sua atividade enzimática (Norton, 1991).

A co-evolução de inibidores de proteinase (IPs) de plantas fornece um interessante e novo paradigma para pesquisas ecológicas fisiológicas e bioquímicas. As plantas parecem ter desenvolvido IPs com extraordinária propriedade contra proteinases de insetos. Eles são extremamente resistentes a proteólise e permanecem ativos sob diversos pHs intestinais (Christeller *et al.*, 1994), além de serem indicados como inibidores contra quase todas as classes de proteinases.

Atualmente, tratamentos não convencionais têm revelado bons resultados na terapia antifúngica. Estudos *in vitro* sugerem que inibidores de protease do HIV podem mostrar propriedade inibitória em relação aos fatores de virulência de *C. albicans* (Cassone *et al.*, 1999). Estudos em animais também revelaram a ação desses inibidores de protease na redução da virulência desses microrganismos em candidose experimental, após terapia com inibidores de protease do HIV (Korting *et al.*, 1999) dentre eles o Saquinavir e o Amprenavir demonstram bons resultados (Pichova *et al.*, 2001) reduzindo a incidência de infecções fúngicas em pacientes infectados por HIV. As proteinases de *Candida* possuem importante participação nas etapas iniciais das infecções fúngicas e na degradação das superfícies epiteliais (Borg & Ruchel, 1988; Ray & Payne, 1988). O potencial antifúngico dos inibidores de protease de HIV se deve ao fato das proteases de HIV pertencerem a mesma classe das proteases aspartato de *Cândida* spp, que é um importante fator de virulência dessa levedura (Hoegl *et al.*, 1999; Korting *et al.*, 1999).

Uma série de inibidores de protease foram avaliados *in vitro* para determinar o potencial inibitório em relação a atividade proteolítica de *Cândida albicans*. Ritonavir inibiu parcialmente o crescimento das leveduras em 44%, assim como a atividade das proteinases aspartil secretadas em (YCB-BSA). Saquinavir, outro inibidor avaliado, não inibiu o crescimento de *C. albicans* e as aspartil proteinases secretadas foram inibidas somente quando as concentrações da droga eram elevadas (Blanco *et al.*, 2003)

Testes realizados com Inibidores de protease realizados pelo método de difusão em ágar demonstraram inibição no crescimento de espécies de *Candida* (Mata-Essayag *et al.*, 2001). Estudos com inibidores de protease demonstraram também o potencial dessa droga em inibir a adesão dessa levedura em células epiteliais (Bektic *et al.*, 2001)

Inibidores de enzimas proteolíticas são comumente encontrados em plantas, isso porque, muitos fitopatógenos são produtores de proteinase extracelular e, em resposta, ao ataque dessas proteinases as plantas sintetizam inibidores que podem suprimir a atividade dessas enzimas (Kim *et al.*, 2005). sendo indicados como candidatos para a obtenção de novos compostos para o desenvolvimento de novos agentes antifécciosos.

A natureza de forma geral tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais as condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também as condições de adaptação e regulação (Reinbothe *et al.*, 1990).

Dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitofarmacos avaliadas frente a microrganismos sensíveis e resistentes a antibióticos são

relevante permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados. A utilização desses produtos naturais economicamente mais viáveis mostra-se como uma alternativa que contribui para um melhor acesso da população aos cuidados básicos no tratamento de infecções.

7 Conclusão

Sob as condições experimentais utilizadas nesse estudo, é válido concluir que:

a) as amostras de *Candida albicans* provenientes da cavidade bucal humana possuem uma evidente atividade enzimática das proteinases;

b) os extratos diclorometânicos de *Arctium lappa*, *Casearia sylvestris* e *Mentha piperita* apresentaram baixa atividade anti-Candida;

c) o extrato metanólico de *Arrabidaea chica* demonstrou ser ativo em *Candida* spp e em isolados clínicos de *Candida albicans*;

d) os extratos diclorometânicos de *Arrabidaea chica*, *Casearia sylvestris* e *Mentha piperita* demonstraram evidente atividade inibitória em relação as proteinases de *Candida albicans*.

Referências

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(9): 4168-70.

Almeida RN, Navarro DS, de Assis TS, de Medeiros IA, Thomas G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. *J Ethnopharmacol*. 1998; 63(3): 247-52.

Almeida Alves TM, Ribeiro FL, Kloos H, Zani CL. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96(6): 831-3.

Aly R, Maibach HI, Rahman R, Shinefield HR, Mandel AD. Correlation of human in vivo and in vitro cutaneous antimicrobial factors. *J Infect Dis*. 1975; 131(5): 579-83.

Amoroso A, Garzia P, Ferri GM, Clementia C, Battaglia T, Clemenzia G. Hypertension and menopausal syndrome: effects of hormone replacement therapy and antihypertensive drugs. *Riv Eur Sci Med Farmacol*. 1996; 18(4): 149-52.

Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti N, Cassone A. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis*. 1996; 173(3): 684-90.

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P. chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(11): 3530-5.

Arantes A, Carvalho Eda S, Medeiros EA, Farhat CK, Mantese OC. Pediatric risk of mortality and hospital infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25(9): 783-5.

Bernardis F. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol*. 2001; 39: 303-13.

Borg, M, Ruchel, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. During experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun*. 1998; 56(3): 626-31.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andriao-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, et al.. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000; 127(1): 21-30.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi AM, Rucavado A, et al.. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*. 2001; 39(12): 1863-9.

Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48(1): 61-9.

Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzymotyping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(5): 437-42.

Carvalho PR, Furlan M, Young MC, Kingston DG, Bolzani VS. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry*. 1998; 49(6): 1659-62.

Cassone A., Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. *In vitro* and *in vivo* anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. J Infect Dis. 1999; 180(2): 448-53.

Chapman E, Perkin AG, Robinson R. The colouring matters of carajura. J Chem Soc. 1927: 3015-41.

Colombo AL, Barchiesi E, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 535-40.

Correa AF, Andrade LR, Soares MJ. Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms. Parasitol Res. 2002; 88(10): 875-80.

Corrêa AD, Batista RS, Quintas LEM. Plantas medicinais – do cultivo a terapêutica. 5.ed. Petrópolis: Vozes; 2002.

Daval JL, Nehlig A, Nicolas F. Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. Life Sci. 1991; 49(20): 1435-53.

Della Casa V, Hofer I, Weiner I, Feldon J. Effects of smoking status and schizotypy on latent inhibition. J Psychopharmacol. 1999; 13(1): 45-57.

Devia B, Llabres G, Wouters J, Dupont L, Escribano-Bailon MT, Pascual-Teresa S, et al. New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. Phytochem Anal. 2002; 13(2): 114-9.

Djilas SM, Markov SL, Cvetkovic DD, Canadanovic-Brunet JM, Cetkovic GS, Tumbas VT. Antimicrobial and free radical scavenging activities of *Teucrium montanum*. Fitoterapia. 2006; 77(5): 401-3.

Dorman HJ, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(16): 4563-9.

Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005; 97(2): 305-11.

Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*. 1999; 6(2): 107-13.

Emerenciano VP, Militao JS, Campos CC, Romoff P, Kaplan MA, Zambon M, et al.. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem Syst Ecol*. 2001; 29(9): 947-957.

Espindola LS, Vasconcelos Junior JR, Mesquita ML, Marquie P, Paula JE, Mambu L, et al.. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Med*. 2004; 70(11): 1093-5.

Ferro, D. *Fitoterapia conceitos clínicos*. São Paulo: Ateneu; 2006.

Foster, S. *Peppermint, Mentha X piperita*. Botanical Series n.306. Austin, TX: American Botanical Council; 1990.

Fox R. Interview: Renee Fox. *Forum Med*. 1980; 3(12): 774-81.

Freitas Mda G, Duarte AC. [Asthma and pregnancy -- efficacy and safety of medication during pregnancy]. *Rev Port Pneumol*. 2004; 10(5): 405-19.

Gentil V. Academic psychiatry in Brazil: confronting the challenges. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(4): 323-4. Errata: *Mol Psychiatry*. 2005; 10(6): 613.

Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*. 1990; 33(6): 265-82.

Giamperi L, Fraternali D, Bucchini A, Ricci D. Antioxidant activity of *Citrus paradisi* seeds glyceric extract. *Fitoterapia*. 2004; 75(2): 221-4.

Goodman MB, Art JJ. Variations in the ensemble of potassium currents underlying resonance in turtle hair cells. *J Physiol*. 1996; 497(2): 395-412.

Gottlieb AA, Sizemore RC, Gottlieb MS, Kern CH. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. *Biotherapy*. 1996; 9(1-3): 27-31.

Guenther J, Nick H, Monard D. A glia-derived neurite-promoting factor with protease inhibitory activity. *EMBO J*. 1985; 4(8): 1963-6.

Guenther E. Essential oils of the plant family Labiatae: oil of rosemary. In: Guenther E. *The essential oils*. Florida: Kreiger Publishing Company; 1974. p.695-709.

Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, et al. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(14): 3958-65.

Harborne JB. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep*. 1999; 16(4): 509-23.

Heinrich R. Drug compliance in elderly patients] *Krankenkpf J*. 2000; 38(5): 182.

Heywood P, Netts P. Antibiotic policies. *Practitioner*. 1993; 237(1532): 863-5.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(7): 1027-31 .

Homma K, Matsuyama K, Komano H, Natori S. The fate of the prosegment in the acute-phase and programmed synthesis of sapecin, an antibacterial peptide of the flesh fly (*Sarcophaga peregrina*). Biochem J. 1992; 288(1): 281-4.

Hough LB, Nalwalk JW, Leurs R, Menge WM, Timmerman H. Antinociceptive activity of impentamine, a histamine congener, after CNS administration. Life Sci. 1999; 64(5): PL79-86.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology. 2001; 147(8): 1997-2005.

Ilori M, Sheteolu AO, Omonigbehin EA, Adeneye AA. Antidiarrhoeal activities of *Ocimum gratissimum* (*Lamiaceae*). J Diarrhoeal Dis Res. 1996; 14(4): 283-5.

Itokawa H, Ichihara Y, Watanabe K, Takeya K. An antitumor principle from *Euphorbia lathyris*. Planta Med. 1989; 55(3): 271-2.

Itokawa H. Research on antineoplastic drugs from natural sources. Especially from higher plants]. Yakugaku Zasshi. 1988; 108(9): 824-41.

Itokawa H, Totsuka N, Takeya K, Watanabe K, Obata E. Antitumor principle from *Casearia sylvestris* Sw (*Flacourtiaceae*) structure elicitation of the new clerodane diterpenos by 2-D NMR spectroscopy. Chem Pharm Bull. 1988; 36: 1585-8.

Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* 2006; 72(14): 1330-4.

Kong QP, Yao YG, Huang SY, Huang JF, Zhang YP. Mitochondrial DNA control region and cytochrome b sequence variation in the genus *Mystacoleucus* Gunther (Pisces: Cyprinidae: Barbinae) from China. *Biochem Genet.* 2003; 41(9-10): 305-13.

Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(8): 2038-42.

Lacaz CZ. Anaerobic bacteria. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1979; 21(4 Suppl 3): IX.

Lagrota MHC, Wigg MD, Aguiar AN, Pinto AV, Pinto MD. Antiviral activity of naphthoquinones. I Lapachol derivatives against enteroviruses. *Rev Latinoam Microbiol.* 1986; 28(3): 221-6.

Lerner CG, Goldman RC. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *J Gen Microbiol.* 1993; 139(7): 1643-51.

Lodder J, Khoudokormoff B, Langejan A. Melibiose-fermenting baker's yeast hybrids. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1969; 35(Suppl. F9).

Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39(6): 540-3.

Lorenzi NM. The Medical Library Association in the 1980s: the global view. *Bull Med Libr Assoc*. 1991; 79(2): 239-40.

Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquática, parasita, tóxicas e medicinais. 2ed. Nova Odessa: Plantarum; 1991.

Mac Donald A. [The Canadian legislation regulating consent to a therapy]. *Prof Infirm*. Apr-Jun;48(2):27-8; 1995.

Maciel Mdo S, Viegas LC, Nonogaki S, Nishimoto IN, Abrao FS, Mourao Neto M, et al. P53 expression is a factor for prognostic assessment in breast sarcoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2002; 71(3): 193-202.

Mardegan RC. Byotyping and genotyping diversity among oral *Candida albicans* strains from caries free and caries activity healthy children. *Braz Journal of Microbiol*. 2006; 37: 26-32.

Matos FJA. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE; 1989. 2v.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 25(2): 136-44.

McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res*. 2006; 20(8): 619-33.

Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, Paula JE, Espindola LS. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. J Ethnopharmacol. 2007; 110(1): 165-70.

Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B, Matavulj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. Planta Med. 2003; 69(5): 413-9.

Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. J Agric Food Chem. 2004; 52(9): 2485-9.

Mimica-Dukic N, Kujundzic S, Sokovic M, Couladis M. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill obtained by different distillation conditions. Phytother Res. 2003; 17(4): 368-71.

Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Mol Microbiol. 1994; 13(2): 357-68.

Mors WB, Rizzini CT, Pereria NA. Medicinal plants of Brazil. Algonac: Reference Publications; 2000.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Document M27-A. Wayne: NCCLS; 1997.

Negi M, Tsuboi R, Matsui T, Ogawa H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. J Invest Dermatol. 1984; 83(1): 32-6

Niero R, Alves RV, Filho VC, Calixto JB, Hawkes JE, Sant'Ana AE, Yunes RA. A new anti-oedematogenic nor-pregnane derivative isolated from *Mandevilla illustris*. *Planta Med.* 2002; 68(9): 850-3.

Niimi Y, Yamane S, Yamaji K, Tayama E, Sueoka A, Nose Y. Protein adsorption and platelet adhesion on the surface of an oxygenator membrane. *ASAIO J.* 1997; 43(5): M706-10.

Oberlies NH, Burgess JP, Navarro HA, Pinos RE, Fairchild CR, Peterson RW, et al. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J Nat Prod.* 2002; 65(2): 95-9.

Odds FC. *Candida* infections in AIDS patients. *Int J STD AIDS.* 1992; 3(3): 157-60.

Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48(1): 71-4.

Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry.* 2004; 65(24): 3249-54.

Panizza, S. *Plantas que curam – cheiro de mato*. 3.ed. São Paulo: IBRASA; 1998.

Pattnaik S, Subramanyam VR, Kole C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios.* 1996; 86(349): 237-46.

Pauletti PM, Castro-Gamboa I, Siqueira Silva DH, Young MC, Tomazela DM, Eberlin MN, et al. New antioxidant C-glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samydoides*. *J Nat Prod.* 2003; 66(10): 1384-7.

Penha CV, Bezerra LM. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. *Med Mycol.* 2000; 38(1): 1-7.

Pereira AO, Cartucho DJ, Duarte AS, Gil MH, Cabrita AM, Patricio JA, et al. Immobilisation of cardosin A in chitosan sponges as a novel implant for drug delivery. *Curr Drug Discov Technol.* 2005; 2(4): 231-8.

Perin C, Gomez-Jimenez M, Hagen L, Dogimont C, Pech JC, Latche A, et al. Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiol.* 2002; 129(1): 300-9.

Pichova I, Pavlickowa L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae* – Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem.* 2001; 268: 2669-77

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20(1): 7-14.

Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med.* 1997; 63(2): 146-9.

Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun.* 1994; 58(2): 508-14.

Ray TL, Wuepper KD. Recent advances in cutaneous candidiasis. *Int J Dermatol.* 1978; 17(9): 683-90.

Ray TL, Payne CD, Morrow BJ. *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidíasis. *Adv Exper Med Biol.* 1991; 306: 173-83.

Rex A, Sondern U, Voigt JP, Franck S, Fink H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(1): 107-11.

Ricci D, Fraternali D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2005; 98(1-2): 195-200.

Rodrigues AM, De Paula JE, Degallier N, Molez JE, Espindola LS. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006; 22 (2): 314-7.

Ruchel R, Boning B. Detection of *Candida* proteinase by enzyme immunoassay and interaction of the enzyme with alpha-2-macroglobulin. *J Immunol Methods.* 1983; 61(1): 107-16.

Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20(3): 233-44.

Ruchel R, Watters D, Maelicke A. Molecular forms and hydrodynamic properties of acetylcholine receptor from electric tissue. *Eur J Biochem.* 1981; 119(2): 215-23.

Salyers A, Witt D. Virulence factors that promote colonization. In: Salyers A, Witt D, editors. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach.* Washington: ASM Press; 1994. p.30-46.

Sawynok J, Yaksh TL. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Rev.* 1993; 45(1): 43-85.

Sayles RW. Banded Glacial Slates of Permo-carboniferous Age, Showing Possible Seasonal Variations in Deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1916; 2(3):167-70.

Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W, Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol.* 1999; 34(1): 169-80.

Schuerch AR. β -lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukariotic DNA polymerase- α . Inhibitory effect thiol dependency and specificity. *Eur J Biochem.* 1978; 84(1): 197-205.

Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine.* 2003; 10(6-7): 504-10.

Selitreffnikoff CP, Nakata M. New cell wall targets for antifungal drugs. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003; 4(2): 200-5.

Selitreffnikoff CP. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7): 2883-94.

Shokeen P, Ray K, Bala M, Tandon V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis.* 2005; 32(2): 106-11.

Sidrim JJ, Moreira JL, Paixao GC, Lima SB, M Filho RE, Rocha MF, et al. Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(3): 263-70.

Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81(2): 145-54.

Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA. Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Edições UFC; 1991. 416p.

Soylu EM; Soylu S; Kurt S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*. 2006; 161(2): 119-28.

Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48(1): 3-10.

Stephen KW. The value of anti-caries and anti-plaque dentifrices at a community level. *Adv Dent Res*. 1995; 9(2): 127-8.

Takemura M, Nozato N, Oda K, Kobayashi Y, Fukuzawa H, Ohyama K. Active transcription of the pseudogene for subunit 7 of the NADH dehydrogenase in *Marchantia polymorpha* mitochondria. *Mol Gen Genet*. 1995; 247(5): 565-70.

Taylor DR, Town GI, Herbison GP, Boothman-Burrell D, Flannery EM, Hancox B, et al. Asthma control during long-term treatment with regular inhaled salbutamol and salmeterol. *Thorax*. 1998; 53(9): 744-52. Errata: *Thorax*. 1999; 54(2): 188.

Taylor L. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* technical report) [database on the Internet] Raintree nutrition, Inc.; 1969.

Taylor L. Herbal secrets of the Rainforest. Carson City: Prima Health Inc Roaklin; 1998. 313p.

Veiga VF, Nimrichter L, Teixeira CA, Morales MM, Alviano CS, Rodrigues ML, et al. Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. *Cell Biochem Biophys*. 2005; 42(1): 61-74.

Verpoorte R. Setting standards! J Ethnopharmacol. 2206; 106(3): 289.

Wagner BJ, Margolis JW. Age-dependent association of isolated bovine lens multicatalytic proteinase complex (proteasome) with heat-shock protein 90, an endogenous inhibitor. Arch Biochem Biophys. 1995; 323(2): 455-62.

Wagner H, Kreher B, Lotter H. Structure determination of new isomeric naphtha [2,3-b] furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT technique. Helv Chim Acta. 1989; 72: 659-67.

Zorn B, Garcia-Pineros AJ, Castro V, Murillo R, Mora G, Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. Phytochemistry. 2001; 56(8): 831-5.

Anexo

 UNICAMP	 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA CERTIFICADO
<p>Certificamos que o Projeto de pesquisa "Atividade antimicrobiana da própolis e de extratos fitoterápicos na inibição de <i>Candida</i> spp e de proteases de <i>Candida albicans</i>", protocolo CEP nº 020/2004, dos Pesquisadores Rita de Cássia Mardegan e José Francisco Höfling, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - MS e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UNICAMP.</p>	<p>We certify that the research project "<i>Antimicrobial activity of the propolis and phytotherapeutic extracts in the inhibition of Candida spp and proteases of Candida albicans</i>", register number 020/2004, of Rita de Cássia Mardegan and José Francisco Höfling, is in agreement with the recommendations of 196/96 Resolution of the National Health Committee - Brazilian Health Department and was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas - UNICAMP.</p>
<p><i>Cynthia Machado Tabchouy</i> Profa. Dra. Cynthia Pereira Machado Tabchouy Secretaria CEP/FOP/UNICAMP</p>	<p><i>Prof. Dr. Jacky Jorge Júnior</i> Coordenador CEP/FOP/UNICAMP</p>
	<p>Piracicaba - SP, Brasil, 07/04/2004</p>