



**Universidade Estadual de Campinas**  
*Faculdade de Odontologia de Piracicaba*



**VIVIAN FERNANDES FURLETTI GÓES**

Cirurgiã Dentista

**“Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp.”**

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

**Orientador:** Prof. Dr. José Francisco Höfling

**Co-orientador (a):** Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

**Piracicaba**

**2009**

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

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8<sup>a</sup>. / 6159

F978a	<p>Furletti, Vivian Fernandes.</p> <p>Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em <i>Candida</i> spp. / Vivian Fernandes Furletti Góes. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadores: José Francisco Höfling, Marta Cristina Teixeira Duarte.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Microscopia eletrônica de Varredura. 2. Cromatografia de gás. 3. Espectrometria de massa. 4. Análise química. I. Höfling, José Francisco. II. Duarte, Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Action of extracts, essential oils and fractions isolated from medicinal plants on the formation of *Candida* spp. biofilms

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Microscopy, Electron, Scanning. 2. Gas chromatography. 3. Mass spectrometry. 4. Chemical analysis

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Jose Francisco Hofling, Cristiane Duque, Dejanira de Franceschi de Angelis, Renata Maria Teixeira Duarte, Glyn Mara Figueira

Data da Defesa: 19-05-2009

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

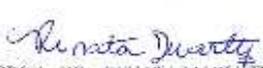


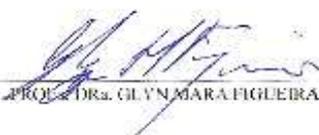
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 19 de Maio de 2009, considerou a candidata VIVIAN FERNANDES FURLETTI aprovada.

  
PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO GUIMBRÃO

  
PROF.ª DRA. CRISTIANE DUQUE

  
PROF.ª DRA. DEJANIRA DE FRANCISCHI DE ANGELIS

  
PROF.ª DRA. KENATA MARIA TELXEIRA DUARTE

  
PROF.ª DRA. GLYN MARA FIGUEIRA

## ***Dedicatória***

### ***A Deus***

*Por ser presença em minha Vida  
e Luz nos meus caminhos.*

Muito obrigada !

### ***Aos meus pais***

***Paulo e Nilva***, que sempre souberam me  
amar quando eu mais precisei. Obrigada pela abdicação  
de tantos sonhos para que os meus pudessem ser realizados.,  
*Minha eterna gratidão pelo amor incondicional,  
pelo carinho, apoio e incentivo.*  
*Muito obrigada pai! Muito obrigada mãe!*

### ***Ao meu marido***

***Marcelo*** , Obrigada pela companhia, amizade, segurança  
e preocupação ao longo desses anos.  
O seu amor sempre me incentivou a continuar e demonstrou que  
“A maior de todas as artes é a de viver juntos”. Wilian Lyon Phelps  
*Muito obrigada Querido!*

### ***Ao meu irmão***

***Gustavo*** meu verdadeiro amigo e  
companheiro em todos os momentos.  
Sempre solícito e incentivador na busca de meus ideais  
Muito obrigada!

### ***A minha avó***

*Nice, pelo imenso carinho e dedicação  
e acima de tudo amor e respeito!  
À senhora o meu muito obrigado!*

**Às minhas amigas**

*Rosana, Vanessa, Rita, Regiane, Iza, Janaína, Cristiane, Thaís, Flávia  
pelo imenso companheirismo, dedicação,  
ensinamentos, que me auxiliaram durante essa trajetória.  
A vocês muito obrigada!*

**Aos meus queridos orientadores**

**Prof (a) Marta e Prof. Höfling**

*Obrigado por fazerem do aprendizado não um  
trabalho, mas um contentamento. Por fazerem com que  
me sentisse pessoa de valor; por me ajudarem a  
descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez  
melhor. Obrigado por afastarem o medo das coisas que  
podia não compreender, levando-me, por fim, a  
compreendê-las. Por todas as oportunidades que me proporcionaram  
crescimento intelectual, profissional e pessoal. Pela imensa dedicação,  
amizade e carinho.  
A vocês toda a minha admiração e muito obrigado!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pelo acolhimento e pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para a minha formação.

Profa. Dra. Cristiane Duque, Profa. Dra. Dejanira de Fransceschi de Angelis, Profa. Dra. Glyn Mara Figueira, Profa. Dra. Renata Maria Teixeira Duarte por aceitarem compor a banca examinadora deste trabalho de tese.

Profa. Dra. Priscilla de Laet Sant'ana Mariano, Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, Profa. Dra. Mary Ann Foglio, por aceitarem ser suplentes dessa banca de tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, Coordenador do curso de Pós – graduação em Biologia Buco-dental da FOP - Unicamp.

À Profa. Dra. Letícia Monteiro de Barros, que coletou as amostras deste estudo e que gentilmente nos foram cedidas na presente pesquisa.

Aos Profs. Drs. Alexandre Nunes Ponezi, Adilson Sartoratto e Vera Lúcia Garcia Rehder pelos ensinamentos apoio e amizade sempre dispensados.

Aos meus amigos de Pós-graduação Rafael Nóbrega Stipp, Ruchele Dias Nogueira, Alessandra Castro Alves, Paula Aníbal, Gustavo Obando, William Custódio, Bruna Lima, Sérgio Braga da Cruz, Fernando Zamunér pelos bons e inesquecíveis momentos de amizade.

Aos amigos e também funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Anderson Teixeira e Wilma Ferraz, pela amizade, colaboração, disposição e respeito. Minha enorme gratidão.

Aos amigos do CPQBA – Unicamp, Alessandra, Camila, Éricka, Giuliana, Patrícia, Renata pelo companheirismo e amizade.

Aos meus tios Laerte, Diva, Virgínia, José Antônio, Regina, Paulo, Linaura, Ana Lúcia, Carlos pela amizade, companheirismo, carinho, amor e apoio incondicional, minha eterna gratidão.

Aos meus primos Marcelo, Henrique, Denise, Rafael, Renata, Rodrigo, Manuela, Nicolas, Karina, Elisangela, Vanessa, Eduardo pelo amor e incentivo a mim dispensados onde pude notar que o verdadeiro amor não se conhece por aquilo que exige, mas por aquilo que se oferece. A vocês e a toda nossa família, dedico os frutos deste trabalho!

Ao meu sogro e minha sogra José Antônio e Neuza e aos meus cunhados José Prudenciano, Elisabeth e Samantha pelo carinho, incentivo, amizade e presença sincera em todos os momentos que precisei muito obrigado!

As minhas amigas Carolina, Joyce, Joeni, Mariana, Paula, Claudia, Rosa, Juliana, Luciana, Mariazinha, Marcela pelo carinho, alegria, amor, incentivo e pelo sentimento mais nobre que nos dedicamos a verdadeira amizade. A vocês agradecimentos eternos.

Aos meus amigos Samuel, Sandro, Roger e Eduardo por fazerem parte da minha vida, pela força, amizade e pelo incentivo. A vocês meu muito obrigado.

A Capes e a Fapesp, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa e auxílio à pesquisa, respectivamente.

***“O sábio não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é o que formula as verdadeiras perguntas.”***

**Claude Levi-Strauss**

## RESUMO

Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* fazem parte da microbiota residente da cavidade bucal, sendo comumente considerados microrganismos comensais inofensivos. No entanto, sob determinadas circunstâncias, podem superar as defesas do hospedeiro e agir como oportunistas, produzindo diversas manifestações clínicas superficiais ou ainda podem estar associados a outras doenças. Estudos recentes indicam uma crescente resistência entre isolados de *Candida albicans* de bolsas periodontais aos antifúngicos azólicos, sugerindo que a cavidade oral pode ser um reservatório de leveduras resistentes. Esta resistência de patógenos humanos a múltiplas drogas é bem conhecida atualmente, e mostra a necessidade da busca de substâncias antimicrobianas a partir de novas fontes, incluindo plantas. Isto pode ser observado devido a um crescente interesse nas medicinas alternativas e nas terapias naturais milenares utilizadas no tratamento de diversas patologias. O objetivo deste trabalho foi estudar a ação de extratos, óleos essenciais de *Allium tuberosum*, *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon winterianus* e *Santolina chamaecyparissus* e frações da planta medicinal de melhor atividade sobre a formação do biofilme de espécies da levedura *Candida* spp. provenientes de amostras clínicas obtidas da cavidade oral de adultos (pacientes portadores de doença periodontal) através da técnica de microdiluição e assim obter a MIC das plantas frente aos isolados de *Candida* spp. Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foram realizadas com intenção de se verificar se ocorreram alterações morfológicas na parede das leveduras. O material vegetal de melhor atividade contra células planctônicas e biofilme de *Candida* spp. foi o óleo essencial de *Coriandrum sativum*. Como consequência da boa atividade inibitória esse óleo essencial foi fracionado e a fração de melhor atividade foi a do grupamento F<sub>8-10</sub> cuja capacidade de inibição foi considerada forte. Essa fração então foi analisada quimicamente observando-se a presença de três compostos ativos majoritários que demonstraram forte inibição frente às células de levedura sendo que a mistura destes promoveu a melhor MIC (0,0005mg/mL). Através da MEV pode-se observar qualitativamente as mudanças na morfologia das células planctônicas e na estrutura do biofilme das espécies de *Candida*.

Palavras Chaves: *Candida* spp., Biofilme, MEV, Plantas Medicinais, *Coriandrum sativum*

## ABSTRACT

The Fungi, from the genus *Candida*, belong to the macrobiotic residence of the oral cavity. They are known as harmless commensally micro-organisms. However, under certain circumstances, they can overcome the host's defenses and act as opportunistic, producing innumerable clinical manifestations or they might be associated to diseases. Recent studies indicate an increasing resistance of *Candida albicans* isolated periodontal pockets to the azole antifungal, suggesting that the oral cavity can be a reservoir of resistant yeast. This resistance of human pathogens to multiple drugs is well known nowadays and demonstrates the necessity to research for antimicrobial substances from new resources, including plants. This can be noticed due to a growing interest in alternative medicine and natural therapies used in the ancient treatment of various diseases. The purpose of this study was to research on the action of extracts, essential oils of *Allium tuberosum*, *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon winterianus* and *Santolina chamaecyparissus* and fractions of medical plants with the best activity on biofilms formation of species of yeast *Candida* spp. prominent from clinical samples obtained from adults oral cavity (patients with periodontal disease) by the technique of microdilution and thereby obtaining MIC (minimal inhibitory concentration) of the plants against the isolated *Candida* spp. Analysis of scanning electron microscopy (SEM) were also performed with the intention to verify if there were morphological changes on the wall of yeasts. The natural material of best activity against planktonic and biofilm cells of *Candida* spp. was the essential oil of *Coriandrum sativum*. As a result of good inhibitory activity this essential oil was fractionated and the fraction with the best activity was the group F<sub>8-10</sub>, from which the capacity of inhibition was considered strong. This fraction was then chemically analyzed and it was found the presence of three major active components that showed strong inhibition against the yeast cells. The mixture of these substances promoted the best MIC (0.0005 mg / mL). Through the SEM was proved qualitatively changes in the morphological structure of planktonic cells and biofilm cells of *Candida* species.

Key Words: *Candida* spp., Biofilm, SEM, Medicinal Plants, *Coriandrum sativum*

# ***SUMÁRIO***

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>39</b>
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>41</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>113</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>115</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>135</b>

## INTRODUÇÃO

Diversas espécies da levedura *Candida* spp. colonizam, como organismos comensais, a cavidade oral de cerca de 40% da população adulta saudável, sendo *C. albicans* a espécie prevalente (Arendorf & Walker, 1980; Candido *et al.*, 1995). *C. albicans* é também a principal espécie relacionada a candidose, infecção fúngica da cavidade oral humana, embora as espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kruzei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* estejam se tornando comuns em grupos de pacientes imunossuprimidos (Pfaller, 1995; Xu *et al.*, 1999).

A análise de isolados clínicos, provenientes de pacientes com candidose, sugerem que a maioria das infecções por *Candida* spp. originam-se de cepas comensais, que habitavam a cavidade oral, vagina ou o trato gastrointestinal, anteriormente à infecção. Deste modo, a compreensão dos padrões de transmissibilidade e a permanência de fungos comensais têm implicações médicas consideráveis (Kam & Xu, 2002). Peterson *et al.* (1987), associaram a ocorrência de periodontite severa ao isolamento de *Candida* spp. das lesões periodontais. Entretanto, o papel destes microrganismos na patogênese das doenças periodontais ainda não está bem esclarecido.

As superfícies mucosas parecem ser o reservatório principal das leveduras do gênero *Candida*, mas estas podem também ser encontradas no biofilme dental, coagregando-se as bactérias presentes ou aderindo-se diretamente à película salivar que se forma previamente na superfície dentária (Arendorf & Walker, 1980; Bagg & Silverwood, 1986, Nikawa *et al.*, 1998).

Uma notável característica da biologia da *C. albicans* é a habilidade de expressar uma variedade de formas morfológicas. *C. albicans* é um organismo polimórfico o qual está submetido a transições morfológicas entre formas leveduriformes, hifas e pseudohifas (Villar *et al.*, 2004). Ambos estados filamentosos são invasivos, sendo esta propriedade determinante para a penetração nos tecidos durante os primeiros estágios da infecção (Sudbery *et al.*, 2004; Villar *et al.*, 2004), além de que todas as formas morfológicas deste fungo podem formar biofilme (Kunamoto, 2002).

Dados recentes indicam uma crescente resistência entre isolados de *C. albicans* de bolsas periodontais aos antifúngicos azólicos, sugerindo que a cavidade oral pode ser um reservatório de leveduras resistentes. O uso difundido de antibióticos para tratamento da candidose oral sugere ser um fator que contribuiu para o aumento da frequência de

espécies de *Candida* não-*albicans*, especialmente aquelas mais resistentes aos antifúngicos azólicos, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (Dronda *et al.*, 1996).

O problema da resistência de patógenos humanos a múltiplas drogas é bem conhecido atualmente, sendo que a procura de novas substâncias a partir de espécies vegetais é uma das alternativas de antimicrobianos. Extratos e óleos essenciais de várias espécies mostraram-se eficientes no controle do crescimento de fungos relacionados a infecções superficiais da pele (Adam *et al.*, 1998), de bactérias patogênicas bucais (Cecanho *et al.*, 1998, 1999), e de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de biofilmes dentais (Galli *et al.*, 1985).

A atividade antimicrobiana de espécies da CPMA - Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP tem sido estudada na Divisão de Microbiologia para diversas bactérias patogênicas e para a levedura *Candida albicans* ATCC 10231 (Duarte *et al.*, 2003ab, 2004ab; Figueira *et al.*, 2003ab; Foglio *et al.*, 2002, 2003; Rehder *et al.*, 2002, 2004; Rodrigues *et al.*, 2003; Sartoratto *et al.*, 2002ab, 2004).

A partir de uma revisão bibliográfica descrita em capítulo de livro (*Anti-Candida activity of extracts and essential oils from native and exotic medicinal plants in Brazil*, (Duarte & Figueira, 2008) foi possível definir gêneros e espécies de plantas investigadas anteriormente, que se mostraram potencialmente ativas contra *C. albicans*.

O efeito antimicrobiano dos extratos de plantas medicinais pode ser um campo promissor para utilização dessas substâncias no tratamento alternativo da candidose e o estudo desses fitoterápicos poderá ampliar de sobremaneira, os conhecimentos nessa área de interesse.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Candida* spp.

Os fungos são organismos eucariotos e podem ser unicelulares ou multicelulares. O gênero *Candida* pertence à família Cryptococcaceae, da classe Ascomycetes e filo Ascomycota e é caracterizado por leveduras que apresentam formas arredondadas ou ovais que medem aproximadamente de 2,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  e reproduzem-se por brotamento ou gemulação (Guarro, 1998). Algumas espécies, como *C. albicans*, produzem brotos que não se separam uns dos outros; estes brotos formam uma cadeia de células chamada de pseudo-hifas, forma esta necessária para invadir tecidos mais profundos nos quadros de infecção (Molero *et al.*, 1998).

*Candida albicans* é encontrada no meio ambiente na forma unicelular, podendo produzir pseudo-hifas que na maioria das vezes são formadas durante o brotamento simples. Porém, quando os ciclos biológicos de nutrição e reprodução estão em plena atividade, esta pode apresentar forma filamentosa verdadeira; esse fenômeno é conhecido como pleomorfismo que difere do dimorfismo porque independe da temperatura a que o fungo é exposto (Moreira, 1999).

A transição entre os dois fenótipos pode ser induzida *in vitro* em resposta a variações do ambiente como pH e temperatura, ou determinadas substâncias como N-acetilglucosamina ou prolina. O critério mais importante para a patogenicidade é a indução para a forma micelial por macrófagos e componentes do soro. Associado a isso, o grande interesse biológico do dimorfismo é a capacidade do microrganismo mudar de forma e isso estar associado diretamente a sua patogenicidade (Molero *et al.*, 1998).

Buscando descrever os determinantes da patogenicidade destes microrganismos, Ghannoum & Abu-Elteen (1990) observaram que a *C. albicans* e outras espécies exibem características importantes para sua virulência, como composição de sua parede celular com a presença de adesinas (manoproteínas), produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, hialuronidase e condroitina sulfatase) e formação de hifas.

Os fungos do gênero *Candida* spp. vêm recebendo notório destaque na literatura médica. No início da década de 80, *Candida* spp era apenas o sétimo patógeno relacionado com infecções de hospitais dos Estados Unidos da América. No final da década de 80 já era o quinto e hoje, segundo os autores, *Candida* spp, responde por 8% dos casos de infecção hospitalar, sendo o quarto patógeno a ser isolado nos testes

diagnósticos (Colombo & Guimarães, 2003). Portanto, os autores salientam o aumento de infecções hospitalares causadas por *Candida spp.*

## 2.2 Fatores de Virulência de *Candida spp.*

A patogenicidade de um microrganismo é definida como sendo a capacidade deste em causar doença. A prevenção ou a ocorrência vai depender da interação entre o agente causador e o hospedeiro (Ghannoum & Abu-Elteen, 1990). Casadevall & Pirofski (2001) enfatizam, ainda, que a virulência não pode ser considerada como uma característica isolada do microrganismo, mas sim um processo dinâmico e com fenômenos de troca que incluem tanto o hospedeiro como os fatores microbianos.

*Candida spp.* são organismos comensais presentes na cavidade bucal de indivíduos clinicamente saudáveis, sendo isoladas numa frequência que varia de 40 a 60% (Arendorf & Walker, 1980). Vários fatores predisõem ao desenvolvimento da candidíase, como por exemplo, distúrbios endócrinos, gravidez, deficiência de ferro, xerostomia e desordens imunológicas (Samaranayake & Macfarlane, 1982).

Ghannoum & Abu-Elteen (1990) observaram que a *C. albicans* e outras espécies exibem como fatores responsáveis pela virulência, a aderência à célula epitelial, dimorfismo, capacidade de crescimento como blastosporos, pseudo-hifas e hifas, produção de enzimas (proteases, fosfolipases) e endotoxinas de baixo e alto peso molecular, bem como a composição da parede celular que facilita a adesão e penetração através do tecido infectado. Concluem, ainda, que a virulência da *C. albicans* resulta da ação conjunta desses fatores contra as defesas do hospedeiro. Em outro estudo, Senet (1997) corroborou as conclusões destes autores quanto aos determinantes da patogenicidade da *Candida*, ressaltando a importância de um melhor conhecimento dos mecanismos precisos envolvidos na fisiopatologia da candidose, com ênfase na prevenção.

Enfatizando os determinantes da patogenicidade de *Candida*, Fernanado *et al.* (1999) estudaram a presença de fosfatases de superfície em *C. parapsilosis* e demonstraram a associação da atividade fosfatásica ácida e alcalina com o índice de adesão destas cepas a células epiteliais. Os autores observaram, ainda, que os isolados de *C. parapsilosis* que exibiram maior atividade fosfatásica foram os que apresentaram maior capacidade de adesão às células epiteliais bucais humanas. Concluíram assim que

fosfatases de espécies de *Candida* podem desempenhar um papel crucial na potencialização da virulência deste fungo.

Pode se observar que com o aumento da virulência entre as espécies de *Candida* constata-se um maior número de pacientes predispostos a infecções causadas por esses microrganismos oportunistas. Nota-se ainda, que a incidência dessas infecções vem crescendo significativamente nesta última década, e que os pacientes mais acometidos são os imunossuprimidos que se enquadram dentro dos grupos de risco como aqueles sob tratamento para o câncer, transplantados e portadores do HIV (Hube, 2000).

Em resumo, as espécies de *Candida* recebem êxito pela notável capacidade de aderência que leva a formação de biofilme e demonstra a maior patogenicidade dessas leveduras. Esta característica apresenta grande relevância médica e industrial, já que a presença de um biofilme maduro dificulta a ação de antifúngicos e pode tornar-se um reservatório de células com características de resistência a determinadas drogas. No âmbito industrial, pode ocasionar problemas econômicos devido a formações de biofilmes em instalações industriais em companhias de processamento de alimentos (Verstrepen & Klis, 2006).

### 2.2.1 Parede Celular e a Pré-adesão

Uma estrutura de grande importância para as leveduras do gênero *Candida* é sua parede celular, pois essa organela mantém a morfologia característica de cada levedura e, é o primeiro local onde ocorre a interação entre o organismo e o ambiente. Por isso, estudos relacionados à identificação e a distribuição dos componentes da parede celular podem contribuir para o conhecimento do seu papel na patogênese fúngica (ex.: expressão de adesinas e receptores para proteínas do hospedeiro; atividade proteolítica extracelular; hidrofobicidade [Borg & Ruchel, 1988; Calderone & Scheld, 1987; Douglas, 1987; Hazen, 1989; Bouchara *et al.*, 1990]) e na interação parasito-hospedeiro (Lopez-Ribot *et al.*, 1991).

A parede celular dos fungos é formada por aproximadamente 80 a 90% de carboidratos. Três constituintes básicos formam a porção polissacarídica da parede celular: polímeros de glucose com ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$  - 1,6 (b-glucanas); polímeros de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) com ligações  $\beta$  -1,4 (quitina) e polímeros de manose (mananas) em associação covalente com proteínas (glico[mano]proteínas). Além disso, a

parede celular apresenta proteínas (6 a 25%) e uma pequena porção de lipídeos (1 a 7%) (Calderone & Braun, 1991; Chaffin *et al.* 1998; Cabib *et al.*, 2001). Os polímeros de  $\beta$ -glucanas e quitina apresentam uma função estrutural formando um rígido esqueleto que proporciona uma forte propriedade física à célula. Quanto ao ponto de vista quantitativo, as  $\beta$ -glucanas representam o principal constituinte, correspondendo a 47 a 60% do peso da parede celular, enquanto que a quitina, embora sendo minoria (0,6 a 9% em peso), apresenta uma importante função na reprodução do fungo por formar uma constrição entre a célula parenteral e a célula filha durante o brotamento (Cabib *et al.*, 2001).

A parede celular de *Candida* spp. apresenta grande importância na patogenicidade desses microrganismos por proporcionar adesão aos tecidos e a células do hospedeiro, assim como por participar ativamente da modulação da resposta imune do hospedeiro (Chaffin *et al.* 1998). A adesão é um pré-requisito para a colonização e um passo essencial para o estabelecimento da infecção. As espécies de *Candida* possuem algumas características peculiares que favorecem essa adesão, dentre elas a presença de adesinas em suas paredes celulares. O grande repertório de adesinas presente nesses fungos propicia uma enorme variedade de sítios no hospedeiro que servem de porta de entrada para a infecção (Calderone & Braun, 1991; Calderone, 1993). Os componentes da parede celular, incluindo glucanas, quitina e manoproteínas, possuem a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro ativando ou desativando-o (Cassone, 1999), tendo as mananas e manoproteínas como moduladoras de atividade mais potentes (Cassone, 1999).

Para muitos microrganismos a adesão aos tecidos do hospedeiro é essencial para a patogênese, e as características microbianas responsáveis por esta adesão às superfícies das mucosas são considerados atributos da virulência (Casadevall & Pirofski, 2001). O fenômeno de adesão é conferido a proteínas especializadas de superfície celular chamadas de adesinas que se ligam especificamente a aminoácidos ou açúcares na superfície de outras células ou promovem a adesão a superfícies abióticas. Todas as adesinas fúngicas compartilham em comum três domínios estruturais, que são: domínio C-terminal que contém a âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) responsável pela ligação da adesina a parede celular, a porção N-terminal que contém o carboidrato ou peptídeo de ligação e o domínio central caracterizado pela presença de múltiplas repetições de serina e treonina codificados por uma sequência conservada do DNA (Verstrepen & Klis, 2006).

Vários estudos na literatura têm demonstrado o potencial de aderência de isolados de *Candida* spp. a células epiteliais (Biasoli *et al.* 1999; Murphy & Kavanagh, 2001). Em outro trabalho envolvendo células epiteliais, Murphy & Kavanagh (2001) ao tratarem um isolado de *C. albicans* com manosidase observaram um substancial decréscimo (60%) na aderência a células epiteliais, demonstrando a importância deste componente da parede (manoproteínas) no processo de aderência de *C. albicans* aos tecidos do hospedeiro. Na parede celular destes fungos existem algumas enzimas funcionais envolvidas na biossíntese ou remodelação da parede celular, que acompanha o crescimento e divisão celular.

O envolvimento de vários fatores na adesão de *Candida* spp. às células epiteliais tem sido também demonstrado, e entre eles, a atividade proteolítica extracelular (Borg & Rüchel, 1988; Hube, 1996). A secreção de enzimas proteolíticas aumenta a capacidade do fungo para colonizar e penetrar nos tecidos bem como escapar do sistema imune do hospedeiro (Macdonald & Odds, 1980; Borg & Rüchel, 1988; Ray & Payne, 1990; Cutler, 1991; Rüchel *et al.*, 1992; Kaminishi *et al.*, 1995; Kretschmar *et al.*, 1999). O “phenotypic swiching” (mudanças reversíveis nas características fenotípicas das células) também contribui para a aderência, pois permite ao fungo assexuado adaptar-se às mudanças ambientais. Ou seja, quando ocorre alteração no equilíbrio do meio bucal, pode haver mudança na expressão de moléculas de superfície da *Candida* spp. favorecendo sua aderência na mucosa bucal e conseqüentemente infecção (Cannon *et al.*, 1995). Os genes de adesão são ativados por diversos fatores, tais como: saturação do meio por carbono e/ou nitrogênio, mudanças de pH ou alterações nos níveis de etanol. Estas mudanças da forma “não-aderente” para a “aderente” permite uma adaptação das leveduras a estas situações de “stress”.

Tem-se sugerido ainda, que o DNA proviral do HIV pode estar presente em células epiteliais bucais e provocar mudanças na superfície celular, de forma a favorecer a colonização por *Candida* spp. (Qureshi *et al.*, 1995). Posteriormente foi demonstrado que *C. albicans* se liga a um número significativamente maior de células epiteliais bucais de pacientes HIV+ do que de indivíduos saudáveis. Isto pode significar que receptores das células hospedeiras possuem papel decisivo na recorrência de candidíase oral em pacientes infectados pelo HIV (Schwab *et al.*, 1997).

O processo de adesão de espécies de *Candida* às superfícies do hospedeiro é controlado e induzido por várias cascatas de sinalização celular tanto no fungo como também no ambiente, em prol de sua virulência.

Drago *et al.* (2000) observaram que células epiteliais orais promoviam a endocitose de *C. albicans*. Mais tarde, Park *et al.* (2005) corroboraram com este achado ao demonstrarem que o acúmulo de actina na célula epitelial ao redor da hifa internalizada sugeriria a endocitose do fungo por estas células. Assim, concluíram que após a adesão, *C. albicans* invade o epitélio oral *in vitro* através da indução da sua própria endocitose pelas células epiteliais orais.

Para *C. albicans*, a adesão às superfícies do hospedeiro também é de extrema necessidade para ocorrer o desenvolvimento da infecção. Além dessa adesão, há a capacidade de formação de biofilme devido à hidrofobicidade da parede celular. Esta importante característica permite com que *C. albicans* colonize além dos tecidos do hospedeiro, implantes, catéteres e materiais cirúrgicos. Uma das moléculas sinalizadoras, farnesol (“quorum-sensing” molécula), que inibe a formação de hifas em *C. albicans*, tem apresentado também capacidade de prevenir a formação de biofilme por este fungo. Cao *et al.* (2005), utilizando análises de expressões de genes por “microarray” de uma população fúngica tratada com farnesol, caracterizou uma série de produtos gênicos importantes para a formação do biofilme. No entanto, para que ocorra a formação desta comunidade microbiana altamente estruturada, o biofilme, é necessário haver interação entre moléculas presentes na superfície da célula fúngica e na célula epitelial. Evidências sugerem as manoproteínas de *C. albicans* como as principais adesinas responsáveis pela adesão às células do hospedeiro (Tosh & Douglas, 1992).

Usando diferentes espécies de *Candida*, alguns pesquisadores observaram que a aderência ao plástico da placa de Elisa está relacionada a células com hidrofobicidade de superfície (CSH) que contribuem para a interação entre as células e as superfícies, fator importante e que permitiu a aderência de *C. albicans* [Klotz *et al.*, 1985 El- Azzi & Khardori 1999, Glee & Hazen 1995]. Li *et al.* (2003) relataram que CSH desempenhava um papel importante na formação do biofilme de *C. albicans*.

Outros estudos também demonstraram uma correlação positiva entre a habilidade de formação do biofilme e CSH. Em um momento determinado os biofilmes foram tratados com diferentes concentrações de baicaleína (BE) e notou-se que quando foi utilizada uma concentração alta de BE houve um aumento da inibição do biofilme e

simultaneamente a diminuição de CSH. Assim, foi possível perceber que a diminuição de CSH pode contribuir para a inibição da formação de biofilme pela baicaleína. Para confirmar isso, o nível de expressão CSH1, um gene que codifica a proteína CSH, foi analisado. CSH1 foi o primeiro gene que demonstrou desempenhar um papel no fenótipo CSH em *C. albicans*. A perturbação de CSH1 resultou numa diminuição mensurável de CSH e conseqüentemente uma diminuição do nível de aderência de *C. albicans* à fibronectina. Isso porque a diminuição da expressão de CSH1 resultou na inibição da formação do biofilme de *C. albicans*. Os autores concluíram que os biofilmes de *C. albicans* são resistentes às drogas antifúngicas e que com a descoberta da baicaleína pôde-se notar que houve inibição da formação do biofilme por estirpes de *C. albicans*, descoberta que pode ser útil para o desenvolvimento de novas estratégias para redução da incidência das infecções nas quais essas leveduras estão associadas (Singleton *et al.*, 2001, Cao *et al.*, 2008).

Visto a grande complexidade estrutural e funcional da parede celular dos fungos, principalmente os causadores de infecções em humanos, Nimrichter *et al.* (2005) em uma revisão recente, demonstraram que este conjunto de características e a biossíntese destes componentes podem ser considerados como alvos potenciais para drogas e anticorpos antifúngicos. Estes autores descrevem, ainda, novos aspectos de determinados componentes da parede celular no envolvimento direto na patogênese fúngica, como por exemplo: glicolipídios, melanina, proteínas de choque térmico, histonas e antígenos de superfície.

### 2.2.2 Diferenciação celular

*Candida* spp. exibem a capacidade de crescimento tanto na forma de levedura como de micélio (tubo germinativo) em resposta aos diferentes fatores ambientais, fenômeno esse denominado polimorfismo. Experimentos *in vivo* demonstram que esta transição de levedura para micélio deve estar relacionada com a patogenicidade deste microrganismo, passando, então, a ser considerada como um importante fator de virulência (Cutler, 1991). *In vitro*, esta mudança morfológica é facilmente induzida através de algumas características ambientais e/ou nutricionais (como por exemplo: temperatura, pH e fonte de carbono) (Simonetti *et al.*, 1974; Buffo *et al.*, 1984). No entanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de morfogênese e regulação molecular

em *C. albicans* devem ser mais bem esclarecidos (Casanova *et al.* 1997). Por isso vários estudos vêm sendo realizados a fim de se compreender melhor estes eventos para que se possa usá-los no tratamento e prevenção de infecções fúngicas, principalmente em pacientes mais susceptíveis.

A observação de hifas em tecidos infectados e sua maior resistência à fagocitose sugere tratar-se da forma patogênica de *C. albicans*, enquanto a forma ovóide da levedura representa seu estado comensal (Sweet, 1997).

Os eventos de diferenciação celular são induzidos pelas mudanças na expressão de genes que codificam fatores específicos, muitos dos quais são necessários para a virulência do microrganismo (Whiteway & Oberholzer, 2004). A via de transdução de sinal pertencente a família de proteínas Ras – proteína cinase A (PKA) é importante no processo de regulação e diferenciação tanto para a formação de hifas quanto para a virulência de *C. albicans* durante o desenvolvimento da infecção (Lo *et al.*, 1997). Recentemente, Ueno *et al.* (2004) demonstraram que poliaminas apresentam uma ação “upstream” na ativação da via de sinalização da adenilato ciclase elevando a concentração de AMP cíclico intracelular, regulando assim a formação de hifas em *C. albicans*.

### 2.2.3 Formação de biofilmes por microrganismos

Os biofilmes consistem em capas de células embebidas dentro de um polímero extracelular (Baillie & Douglas, 2000), associadas irreversivelmente às superfícies e consórcio de multi-espécies (Costerton *et al.*, 1999; Donlan and Costerton, 2002), representando o tipo mais prevalente de crescimento de microrganismos na natureza, sendo cruciais para o desenvolvimento de infecções clínicas (Davey & O’Toole, 2000). A formação do biofilme em espécies de *C. albicans*, se dá por adesão de uma camada de células flutuantes leveduriformes a uma superfície e sobre estas uma camada de formas filamentosas rodeadas por uma matriz de polissacarídeos (Chandra *et al.*, 2001). O material extracelular produzido pela espécie *C. albicans* contém carboidratos, proteínas e outros componentes ainda desconhecidos, sendo esta composição diferente das células não aderidas (planctônicas) segundo Baillie & Douglas (2000), e muito mais forte e estável quando o biofilme desenvolve-se em meio aquoso, tendo uma resistência muito alta às drogas terapêuticas (Kunamoto, 2002).

Dispositivos implantados como catéteres, válvulas protéticas do coração, assim como dispositivos relacionados, permitem a este patógeno aderir-se à superfície, formando biofilme (Dougherty, 1988). O biofilme produzido pela *C. albicans* consiste em células leveduriformes e filamentosas (hifa e pseudohifa) acopladas numa estrutura bidimensional. O biofilme formado pela *C. albicans* é similar ao formado por outros microrganismos, mas a sua estrutura é altamente dependente das condições sob a qual este esteja formado; esta plasticidade sugere que o biofilme formado no hospedeiro, vai depender da natureza do dispositivo implantado e da sua localização (Kunamoto, 2002). Alguns resultados de pesquisas indicam que a *C. albicans*, o maior patógeno dentre as espécies de *Candida*, produz a maior extensão de biofilme (Kunamoto, 2002). Esta inclui formas leveduriformes e filamentosas, ótimas para a colonização de superfícies inertes, sendo a forma leveduriforme a produtora de uma capa basal adesiva, e a forma filamentar a que provê o suporte para o desenvolvimento de uma estrutura multi-extrato (Baillie & Douglas, 2000).

Muitos biofilmes estão compostos por uma variedade de espécies bacterianas e, algumas vezes inclusive, podem conter misturas de bactérias e fungos. Os membros destes biofilmes têm diferentes características e utilizam diferentes funções metabólicas, apresentando comensalismo, um fenômeno difundido no biofilme (Shapiro, 1998). Por exemplo, em locais onde os colonizadores primários são aeróbios ou anaeróbios facultativos, a difusão de oxigênio através do biofilme, determina aos microrganismos anaeróbios sobreviverem como colonizadores secundários na superfície do biofilme (Loo *et al.*, 2000).

A *C. albicans*, sendo um comensal na cavidade oral, pode-se aderir a outras espécies da microbiota oral, como o *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacterium saburreum* (Reynaud *et al.*, 2001) e *Staphylococcus* spp. (Dahlen, 2006). Outros pesquisadores responsabilizam a *C. albicans* como promotor para a adesão de microrganismos, tais como *Streptococcus* spp, *E. coli* e *Porphyromonas gingivalis* (Branting *et al.*, 1989; Centeno *et al.*, 1983). Estas interações estão associadas a doenças como periodontite (Reynaud *et al.*, 2001), periodontite apical (Slots *et al.*, 1988), necrose da polpa dental e infecções de dentina (Waltimo *et al.*, 2003), já que a levedura possui a capacidade de colonizar a hidroxiapatita como *S. mutans* (Nikawa *et al.*, 1998).

Embora *C. albicans* seja a levedura considerada, majoritariamente, a mais patogênica das espécies de *Candida*, uma variedade de outros membros deste gênero como a *C. krusei*, *Torulopsis glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, têm sido citados como agentes causadores de um aumento no número de infecções (Gilfillan *et al.*, 1998), assim como sua capacidade de adesão a superfícies plásticas (Panagoda *et al.*, 1998; Samaranyake & Nair, 1995; Webb *et al.*, 1998). Este fator de co-agregação pode depender de outros fatores como variações inter ou intra-espécie (Branting *et al.*, 1989) e componentes da parede celular bacteriana (Holmes *et al.*, 1995a).

Nem todos os microrganismos, porém, possuem esta adesão com a *C. albicans*. Esta limitação pode ser observada em certas espécies de *Candida* spp. e em bactérias como a *P. aeruginosa* (Hogan & Kolter, 2002; Hogan *et al.*, 2004), assim como também em *S. epidermidis*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloaca* (El-Azizi *et al.*, 2004).

Ocasionalmente, por razões puramente mecânicas, alguns microrganismos deixam de produzir polímero extracelular e são liberados do biofilme para o meio exterior. As células do biofilme podem ser dispersas pelo crescimento ativo das células irmãs, como resultado dos níveis de nutrientes ou “*quorum sensing*”, ou pelo destacamento de agregados de biofilme (Baselga *et al.*, 1994). Devido ao incremento da camada superficial do biofilme, condições anaeróbias desenvolvem-se no biofilme em locais onde existem microrganismos anaeróbicos. Enzimas polissacarídeas específicas para o polímero extracelular de diferentes organismos podem, possivelmente, ser produzidas durante diferentes fases do desenvolvimento do biofilme dos microrganismos e contribuir no desligamento dos mesmos (Boyd & Chakrabarty, 1994). O modo de dispersão, aparentemente afeta as características fenotípicas do microrganismo. A migração dos agregados do biofilme parece reter certas características no biofilme, como propriedades de resistência antimicrobiana, em comparação às células que têm sido liberadas como resultado do crescimento, podendo reverter rapidamente ao fenótipo planctônico (Donlan, 2002).

Como consequência do desprendimento e liberação das células microbianas planctônicas do biofilme, e a evidência que suporta a idéia que há um padrão natural de programação de liberação e destacamento destas células, estas podem colonizar outras superfícies ou individualmente, formar novas microcolônias (Baselga *et al.*, 1994). No entanto, os biofilmes podem atuar como foco central de uma infecção aguda, se as

defesas do hospedeiro não puderem eliminar as células que são liberadas durante a infecção (Costerton *et al.*, 1999) .

Porém, um trabalho feito em pulmões de ratos comprovou que as microcolônias formadas no processo de desenvolvimento do biofilme ou os microrganismos aderidos dentro deste, liberam antígenos e estimulam a resposta do sistema imune induzindo a produção de anticorpos. Mas, estes anticorpos não são efetivos dentro do biofilme, podendo causar deposições de complexos imunes e danos aos tecidos (Cochrane *et al.*, 1988) .

O desenvolvimento e aplicação de novas ferramentas moleculares em combinação com o avanço de novos microscópios, não somente prove detalhes em imagens 3D da estrutura, mas também da atividade e o estado fisiológico das células individuais do biofilme (Wimpenny *et al.*, 2000). Limitações na difusão devido à estrutura do biofilme resultam na variação local da disponibilidade de nutrientes, pH, e tensão de oxigênio. Consequentemente, os microrganismos dentro do biofilme são inevitavelmente heterogêneos com respeito à expressão genética.

Um estudo onde a atividade dos promotores foi monitorada como uma função da expressão de um fluoróforo indicou que a heterogeneidade na expressão de genes de células individuais existe incluso dentro de microcolônias da mesma espécie (Yarwood *et al.*, 2004) . É provável que esta heterogeneidade se traduza em funções especializadas nas células do biofilme (Yarwood *et al.*, 2004) . Embora não se tenha definição comprovada de que a heterogeneidade no biofilme possa certamente resultar na divisão de funções das espécies certamente incrementa a eficiência metabólica da população como um todo (Jefferson, 2004) .

A maioria dos microrganismos precisa expressar somente uma parte de seu genoma para converter-se numa unidade estrutural e funcional de um micro-sistema. As contínuas trocas no ecossistema podem se acomodar por alterações no padrão de expressões genéticas, requerimento da comunicação entre o ecossistema e a coordenação da expressão genética. O biofilme oral está sujeito a presença de nutrientes que podem alterar as condições entre microrganismos aeróbicos e anaeróbicos e as flutuações do pH. Para minimizar estes processos, o biofilme possui circuitos regulatórios integrados, envolvidos com aspectos fisiológicos celulares numa coordenada resposta às trocas do ecossistema, sendo que estes circuitos regulatórios incluem sistemas de “operons” que estão controlados por uma proteína simples regulatória (Carlsson, 1997) .

Da perspectiva de uma patogênese, a característica mais importante do crescimento em biofilme é a resistência a agentes antimicrobianos exibidos pelos organismos (Kunamoto, 2002). Resultados de muitos estudos têm demonstrado que biofilmes formados por espécies de *Candida* mostram-se mais resistentes a importantes agentes antifúngicos utilizados na clínica, como anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Novos azóis, como voriconazol e ravuconazol, também se mostraram ineficazes contra estes biofilmes (Kuhn *et al.*, 2002).

O mecanismo de resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos ainda não está totalmente elucidado. Uma das hipóteses que pode explicar esta resistência é a presença da matriz restringindo a penetração dos medicamentos através da formação de uma barreira de difusão (Gilbert *et al.*, 2002; Kunamoto, 2002) e somente as camadas mais superficiais estariam em contato com doses letais dos antibióticos.

Porém, alguns pesquisadores têm concluído que esta matriz não constitui uma barreira para a difusão destas drogas (Baillie & Douglas., 2000). A progressão da resistência às drogas para Chandra *et al.* (2001) estaria associada com o aumento da atividade metabólica num biofilme em desenvolvimento, no entanto, este é interrompido e os organismos ressuspensos são expostos a drogas antifúngicas, sendo que estes retêm significativamente a resistência aos antibióticos, indicando que esta característica fenotípica é uma propriedade intrínseca das próprias células (Kunamoto, 2002).

### **2.3 *Candida* spp e doenças periodontais**

Vários fatores são citados como responsáveis pela ocorrência das candidoses orais, alguns relacionados ao hospedeiro e outros à própria levedura. Os mais citados relacionados ao hospedeiro são: diabetes *mellitus* (DM), perda de dentes, restaurações, aparelhos (ortodônticos e protéticos), mudanças de hábitos alimentares, higiene oral, doenças sistêmicas, alterações hormonais, certas drogas sistêmicas e locais, imunodepressão, radiação e quimioterapia (Paula, 1998).

Entre os fatores relacionados com a levedura (também denominados fatores de virulência) encontram-se o fenômeno de aderência (adesina), a forma miceliana, a variabilidade fenotípica, a produção de enzimas extracelulares (protease e fosfolipase) e as toxinas. Após a adesão da levedura às células do hospedeiro, inicia-se a

pseudofilamentação da mesma, já que é uma característica da vida parasitária (Paula, 1998; Vidotto *et al.*, 1999; Menezes *et al.*, 2007).

A patogenia das *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência, destacando-se a produção de enzimas extracelulares, como a proteinase e a fosfolipase, como um dos principais mecanismos de virulência. O amplo espectro da candidíase e a sua significância clínica têm estimulado o interesse no estudo desses mecanismos de patogênese (Candido *et al.* 2000; Menezes *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que estas leveduras podem fazer parte da microbiota normal e ser encontradas facilmente como simples comensais. Portanto, o diagnóstico da candidose depende do isolamento em cultura e da demonstração da patogenia da espécie isolada (Ghannoum & Abu- Eltenm, 1990; Menezes *et al.*, 2007).

A candidose é considerada a mais freqüente infecção fúngica da cavidade oral humana, e *C. albicans* é também a principal espécie relacionada, embora as espécies não-*albicans*, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kruzei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, estejam se tornando comuns em certos grupos de pacientes (Pfaller, 1995; Xu *et al.*, 1999; Samaranayake & Macfarlane, 1982; Repentigny *et al.*, 2004).

A análise de isolados clínicos, provenientes de pacientes com candidose, sugerem que a maioria das infecções por *Candida* spp. originam-se de cepas comensais, que habitavam a cavidade oral, vagina ou o trato gastrointestinal, anteriormente à infecção. Deste modo, a compreensão dos padrões de transmissibilidade e a permanência de fungos comensais têm implicações médicas consideráveis (Kam & Xu, 2002).

A candidose bucal pode apresentar-se clinicamente de três formas distintas: candidíase eritematosa, candidíase pseudomembranosa e queilite angular (Repentigny *et al.*, 2004).

A ocorrência de periodontite severa tem sido associada ao isolamento de espécies de *Candida* spp. a partir das lesões periodontais (Peterson *et al.*, 1987; Slots *et al.*, 1988; Reichart 2003; Boniotto *et al.*, 2004). A levedura, através do acesso aos tecidos produz metabólitos que levam à inflamação. Entretanto, o significado clínico destas observações e o papel destes microrganismos na patogênese das doenças periodontais, ainda não estão bem esclarecidos. Muitas investigações científicas vêm sendo realizadas a fim de aprofundar os conhecimentos nesta área (Robinson, 1996; Lamster *et al.*, 1998). Foi sugerido que, quando *C. albicans* obtém acesso aos tecidos periodontais, estes podem ser prejudicados pela produção de metabólitos por estas leveduras. Waltimo *et al.* (2000),

avaliando a susceptibilidade aos antifúngicos entre isolados de *C. albicans* de bolsas periodontais, demonstrou que 100% destes isolados foram sensíveis à anfotericina B e a 5-fluorocitosina. Contudo, a sensibilidade aos azólicos mostrou-se variável, ocorrendo resistência cruzada. Esse fato vem corroborar recentes dados, que indicam uma crescente resistência aos azólicos entre espécies de *Candida*, sugerindo que a cavidade oral poderia ser um reservatório de leveduras resistentes.

Os mecanismos moleculares de resistência aos antifúngicos pertencentes à família dos azólicos em cepas *C. albicans* isoladas de pacientes HIV são multifatoriais com predominância da “*overexpression*” dos genes (*MDR1* e *CDR*) codificadores da bomba de efluxo, fato esse detectado em 85% de todos os isolados com esta característica fenotípica de resistência (Perea *et al.*, 2001; Sangeorzan *et al.*, 1994 e Barchiesi *et al.*, 1995).

O uso difundido de antifúngicos azólicos para tratamento de candidose oral, principalmente após a era Aids, parece ser um fator preponderante no aumento da frequência de espécies de *Candida não-albicans*, especialmente aquelas naturalmente mais resistentes a esta classe de antifúngicos, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (Dronda *et al.*, 1996). Dados provenientes de alguns estudos sugerem que o tratamento prolongado ou intermitente com antifúngicos, modifica a prevalência de *C. albicans*, aumentando a frequência de outras espécies de *Candida* spp. (Persons *et al.*, 1991; Millon *et al.*, 1994).

A distribuição das diferentes espécies de *Candida* em populações homogêneas saudáveis ainda é pouco conhecida, uma vez que a maioria dos estudos é realizada com grupos de indivíduos imunocomprometidos.

## **2.4 Mecanismos de ação de antifúngicos**

Comparadas às infecções bacterianas, poucas drogas estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas. Isto é atribuível à natureza eucariótica das células fúngicas e a dificuldade em identificar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos. A maioria das terapias designadas para tratar infecções fúngicas visa a via biossintética do ergosterol, um esteroide componente da membrana celular que é único para fungo. A droga mais comumente usada no tratamento e prevenção da candidíase é o fluconazol, um membro da família dos azóis cujo alvo é a enzima Erg 11, lanosterol 14 $\alpha$ -

demetilase, na via biossintética do ergosterol. A terapia padrão para o tratamento de infecções resistentes ao fluconazol é a anfotericina B, que se liga ao ergosterol e permeabiliza a membrana plasmática (Onyewu et al., 2003). Assim como a Anfotericina B, a nistatina englobada na classificação de um antifúngico poliênico forma complexos com o ergosterol de membrana, ocasionando um aumento da permeabilidade na mesma, a qual libera seu conteúdo intracelular acabando por conduzir na morte da célula.

Esses tratamentos são extremamente efetivos, mas linhagens e espécies resistentes de *Candida* estão emergindo e novos tratamentos para infecções sistêmicas necessitam ser desenvolvidos. Um inconveniente dos azóis é que eles são muitas vezes fungistáticos e não fungicidas, o que provavelmente contribui para o desenvolvimento de resistência nos isolados clínicos de pacientes imunocomprometidos.

Entretanto, Kam & Xu (2002), relataram que os hospedeiros humanos saudáveis podem ser altamente heterogêneos quanto à composição das espécies que abrigam, sendo que um único hospedeiro pode abrigar múltiplas espécies ou múltiplos genótipos da mesma espécie, resultando num processo dinâmico de colonização. Ainda, distintos subgrupos genotípicos de *C. albicans* podem variar quanto à suscetibilidade aos antifúngicos ou quanto à virulência (Al-Karaawi et al., 2002).

*C. albicans* é dividida antigenicamente em dois sorotipos, baseando-se na presença do antígeno de superfície A ou B, originalmente descritos por Hasenclever & Mitchell (1961). Portanto, existe uma prevalência variável dos sorotipos A e B, associada por alguns autores à diversidade geográfica, pressão seletiva de antifúngicos, estado imune, fatores do hospedeiro, além de divergências entre os métodos de sorotipagem. Foi relatado que amostras pertencentes ao sorotipo B apresentam MIC(s) (concentrações mínimas inibitórias) significativamente elevadas para fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina, quando comparadas com as do sorotipo A. Em populações de indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos, estudos relatam uma predominância do sorotipo A, em ambos os casos (Williams et al., 2000). No Brasil, o sorotipo A de *C. albicans*, parece ser o mais prevalente fenótipo isolado, de acordo com estudos feitos em população predominantemente de pacientes HIV positivos. Dados mais precisos com relação a esta prevalência na população, ainda são escassos (Pires et al., 1996; Sant'Ana et al., 2002). No entanto, recentes estudos demonstram um aumento da prevalência do sorotipo B em pacientes HIV positivos (Brawner & Cutler, 1989; Barturen et al., 1995;).

Estudos recentes revelaram que uma família de peptídeos secretados na saliva, as histidinas, apresenta atividade contra fungos patogênicos, incluindo a levedura *C. albicans* (Rayhan *et al.*, 1992). Posteriormente, demonstrou-se que um destes peptídeos, a histidina 5, liga-se a receptores da membrana plasmática, sendo captada pelas células e associando-se intracelularmente com as mitocôndrias. Na mitocôndria, estes peptídeos provocam uma série de eventos citotóxicos, como depleção do ATP intracelular, diminuição da atividade respiratória e formação de espécies reativas de oxigênio (Helmerhorst *et al.*, 2001). O composto acarreta ainda perda de volume celular e interrupção do ciclo de vida do organismo (Kavanagh e Dowd, 2004).

Bakkali *et al.* (2005) investigaram uma possível genotoxicidade dos óleos essenciais de cinco espécies de plantas medicinais usadas em aplicações farmacológicas tradicionais, sobre diferentes cepas da levedura *S. cerevisiae*, causando efeitos genotóxicos maiores na fase exponencial do que na fase estacionária. A citotoxicidade foi descrita na seguinte ordem: *Origanum compactum* > *Coriandrum sativum* > *Artemisia herba alba* > *Cinnamomum camphora* > *Helichrysum italicum*. Alguns derivados de *H. italicum* induziram claramente a mutação citoplasmática, pois exerce efeito sobre o DNA mitocondrial da levedura, modificando sua estrutura e função, podendo estimular a expressão transcricional do DNA causando danos aos genes responsáveis pela respiração celular.

O relevante papel que as espécies de *Candida* spp. desempenham na ecologia da cavidade bucal, (no estado de saúde, nas infecções e na formação de biofilmes dentais), além da perspectiva de maiores estudos sobre a associação dessas leveduras com as doenças periodontais, fazem desses microrganismos alvo de muitas pesquisas. Leva-se em conta ainda a resistência entre isolados de *C. albicans* de bolsas periodontais aos antifúngicos azólicos, sugerindo que a cavidade oral pode ser um reservatório de leveduras resistentes. A resistência desses patógenos humanos a múltiplas drogas é bem conhecida atualmente, e mostra a necessidade da busca de substâncias antimicrobianas a partir de novas fontes, incluindo plantas utilizadas na medicina popular, por apresentarem grande variedade de compostos com propriedades terapêuticas.

## **2.5 Plantas Medicinais**

### **2.5.1 Plantas Medicinais e a Abordagem etnobotânica**

Segundo informações da Organização Mundial de Saúde (OMS), 60% da população mundial utilizam medicamentos tradicionais, baseados em uma história de utilização prolongada, com frequência milenar (OMS, 2002b). Entre as práticas consideradas tradicionais destaca-se o uso de produtos à base de plantas medicinais.

Apesar de sustentar-se em história milenar, a infra-estrutura para a pesquisa em medicina tradicional está muito menos desenvolvida que a da medicina convencional. Apenas 25 dos 191 países membros da OMS têm desenvolvido políticas referentes à medicina tradicional e/ou complementar e alternativa, sendo que o Brasil não figura neste pequeno grupo (OMS, 2002a). Entretanto, tem havido um apelo insistente e crescente, nos dias atuais, para que se determine a inocuidade e eficácia desta prática, sendo frisado como importante que se preste apoio à criação de infra-estrutura apropriada no âmbito acadêmico e em outras instituições (OMS, 2002b).

Por outro lado, é sabido que o Brasil, possuidor da maior biodiversidade do planeta, possui uma imensa flora medicinal nativa ainda desconhecida ou pouco estudada. Também se sabe que, apesar de nossa condição privilegiada de biodiversidade, utilizamos, e muito, as plantas medicinais exóticas, sendo que os valores de importação superam amplamente os de exportação para estes produtos. Assim, torna-se mais do que necessário que se invista em pesquisas nesta área, em nossa flora nativa, sendo a etnobotânica e a etnofarmacologia importantes ferramentas para se trabalhar neste objetivo.

Entre as diversas definições para etnobotânica, Amorozo (1996) afirma que esta é a ciência que se ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas pelas sociedades a respeito do mundo vegetal, englobando o uso que se dá a ele. É uma ciência altamente interdisciplinar, pois trata de aspectos da botânica, antropologia, arqueologia, fitoquímica, farmacologia, medicina, história, religião, geografia e diversas outras ciências e artes pertinentes (Schultes e Reis, 1997). A etnobotânica aplicada ao estudo das plantas medicinais trabalha em estreita cumplicidade com a etnofarmacologia, a qual consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (Amorozo, 1996).

A importância de se estudar o conhecimento e uso tradicional das plantas medicinais pode ter 3 implicações distintas (Amorozo, 1996; Elisabetsky, 2001): resgatar o patrimônio cultural tradicional, assegurando a sobrevivência e perpetuação do mesmo; otimizar os usos populares correntes, desenvolvendo preparados terapêuticos (remédios caseiros) de baixo custo e organizar os conhecimentos tradicionais de maneira a utilizá-los em processos de desenvolvimento tecnológico.

Amorozo (1996) acrescenta que este tipo de abordagem, oriundo de tradição popular “boca a boca”, pode fornecer muitas informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos, com grande economia de tempo e dinheiro, permitindo o planejamento da pesquisa a partir de um conhecimento empírico já existente, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, que então poderá ser testado em bases científicas.

Com relação à otimização dos usos populares correntes, segundo estimativa da OMS, um terço da população mundial não tem acesso periódico a medicamentos essenciais, sendo necessário que se invista na medicina alternativa (WHO, 2002).

As atividades humanas tradicionais influenciam tanto os cultivos quanto a vegetação natural circundante, sendo importante o conhecimento destes sistemas e do respectivo manejo, visando o controle de ervas daninhas, pragas e doenças, o desenvolvimento de cultivos em terras consideradas marginais, conservação de recursos genéticos, produção agrícola sustentável etc. (Shultes & Reis, 1997).

Ainda em relação ao aspecto de produção de plantas medicinais cabe aqui lembrar que muito tem sido falado a respeito dos cuidados que se tem que ter neste segmento, uma vez que a produção dos princípios ativos por estas plantas depende de uma série de fatores durante o crescimento vegetal e nos procedimentos após a coleta. Em função desta preocupação, a OMS publicou recentemente o guia de boas práticas agrícolas e de coleta para plantas medicinais, afirmando que reconhece que tem sido dada atenção insuficiente na questão da garantia de qualidade e controle da produção destes materiais vegetais (WHO, 2002).

Para se garantir a padronização completa de um produto fitoterápico, necessita-se conhecer a influência de outros fatores sobre a qualidade química da matéria-prima vegetal, pois de fato as plantas podem apresentar variabilidade ao longo das diversas estações do ano ou ao serem secas e extraídas de diferentes formas. Conhecer tais relações representa passo importante no domínio global da tecnologia referente a essa

droga vegetal. Um fator a ser considerado durante a colheita é o estágio de desenvolvimento da planta, pois variações grandes no conteúdo do princípio ativo são freqüentemente observadas quando se varia a época da colheita (Oliveira *et al.*, 1998). Martins *et al.* (1995) mencionam também que, de acordo com as substâncias presentes na planta, existem horários em que a sua concentração é maior (Vigo *et al.*, 2004).

Outro fator a ser investigado é a secagem, que tem como objetivo eliminar certa quantidade de água do órgão vegetal, dessa forma possibilitando a conservação das drogas vegetais. Existem processos naturais (secagem ao sol, à sombra, mistos) e artificiais (circulação de ar, aquecimento com circulação de ar, vácuo e esfriamento) (Oliveira *et al.*, 1998). A verificação da interferência desses vários tipos de secagem sobre os teores de ativos e as características físico-químicas da droga contribui à utilização do melhor perfil de técnicas que propicie a maior qualidade possível dessa matéria-prima. (Vigo *et al.*, 2004).

Como produto final de uma série de sugestões apresentadas por diferentes segmentos da sociedade, foi estabelecido uma legislação para a área de fitoterápicos (Portaria 6/SVS de 31/1/1995), que definiu claramente que fitoterápico é um medicamento com componentes ativos exclusivamente de origem vegetal, e que deve apresentar comprovação de eficácia, segurança e qualidade. Também determinou prazos para a realização de estudos de eficácia e toxicidade para os produtos já existentes no mercado, estabelecendo bases para uma maior aceitação desses produtos. Essa legislação exerceu um papel educativo importante e foi reformulada, mantendo suas características essenciais (Resolução RDC n<sup>o</sup> 17 de 24/2/2000). Também importante, foi o estabelecimento, no Ministério da Saúde e, posteriormente, na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, de uma divisão direcionada especificamente para fitoterápicos. Sem um órgão executivo, o processo não seria completo, qualquer que fosse a legislação estabelecida, pois essa por si só não assegura os instrumentos para a melhoria da qualidade dos produtos no mercado.

No segmento industrial, é nítido o ressurgimento do interesse em produtos naturais como fonte de modelos para fármacos (O'neil & Lewis, 1993; Kingston, 1996; Shu, 1998, Harvey, 2000) e como matéria-prima para desenvolvimento de fitoterápicos (Schenkel *et al.*, 2001). Nos EUA, ocorreu uma expansão marcante desse mercado. Por exemplo, para produtos contendo kava-kava, entre 1997 e 1998, foi registrada uma expansão de 461% e para o hipérico, 190% (Blumenthal *et al.*, 2000). Dados recentes

mostram aumentos na venda de valeriana (70,5%) e chá-verde (39,4%), entre 1999 e 2000 (Blumenthal, 2001). Além disso, têm sido desenvolvidos estudos de farmacoeconomia com matérias-primas vegetais, mostrando seu impacto na economia de certos países (De Smet *et al.*, 2000).

Nosso país possui a maior base universitária das Américas, excluindo os EUA; nossos cientistas publicam em revistas de grande impacto; nosso sistema de pós-graduação é de excelente nível e serve de exemplo para vários outros países. Existe uma inegável capacitação científica em quase todas as áreas relacionadas com o assunto em pauta. Muitas patentes que geraram medicamentos, hoje comercializados por empresas multinacionais, tiveram origem em universidades brasileiras. Temos, ainda, a maior biodiversidade do planeta e algumas universidades brasileiras possuem equipamentos analíticos equivalentes aos das grandes universidades estrangeiras. No entanto, os recursos para financiar tais pesquisas não são suficientes em volume e constância, tendo em vista o alto custo do desenvolvimento destes produtos (Simões & Schenkel, 2002).

Existe ainda uma falta de tradição das indústrias farmacêuticas brasileiras em investir em Pesquisa e Desenvolvimento - P&D - e isto é muito forte nas indústrias de fitoterápicos, geralmente, empresas familiares de pequeno ou médio porte. Dentre essas, apenas algumas poucas se destacam pelo profissionalismo e seriedade com que atuam na área, mantendo inclusive acordos de cooperação com Universidades, objetivando garantir a qualidade, eficácia e segurança de seus produtos (Simões & Schenkel, 2002).

### **2.5.2 Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Fitofármacos.**

A OMS define planta medicinal como sendo “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 planta medicinal e 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”.

Com relação aos fitoterápicos, foram abordados por Veiga Jr *et al.*, 2005 pontos que merecem atenção especial, enfocando a presença de substâncias “não identificadas”, adulterantes, diluentes, ou simplesmente misturas com outros extratos vegetais. Neste último caso, existe a possibilidade do comprometimento da qualidade do fitoterápico, um assunto que vem sendo abordado recentemente em publicações científicas (Veiga Jr. *et al.*, 2005).

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 garrafadas), interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos (que possam estar sendo ingeridos pelo usuário da planta), efeitos de superdosagens, reações alérgicas ou tóxicas.

### **2.5.3 Plantas Medicinais e possíveis reações adversas**

O uso milenar de plantas medicinais mostrou ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos.

O intenso apelo comercial advindo do forte movimento cultural dos naturalistas aqueceu, em todo o mundo, o consumo de plantas medicinais. Entretanto, não há respeito aos limites de uso dos fitoterápicos, não se fornecem informações sobre efeitos colaterais, e o consumo de plantas, do modo com vem sendo feito, representa cada vez mais um

risco para a saúde humana. Estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacólogos, tornam-se cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (Veiga Jr. *et al.*, 2005).

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúxico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial. Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (Hoene, 1939; Veiga Jr *et al.*, 2005).

Um dos efeitos tóxicos relatados recentemente foi ocasionado pelo uso de cápsulas de têucrío (*Teucrium chamaedrys* L. – Labiateae), que causou uma epidemia de hepatite na França. A origem do efeito tóxico foi atribuída a diterpenos do tipo *neoclerodano*, transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos, que apresentavam uma subunidade epóxido. Anteriormente, o uso do têucrío era tido como seguro até que a comercialização do vegetal em cápsulas associado à camomila, prescrito para dietas de emagrecimento, desencadeou os casos de hepatite tóxica. Estudos farmacológicos mostraram que os diterpenóides furânicos (muitos estão presentes entre os clerodanos) causam apoptose dentro de 2 h em hepatócitos de ratos. Metabólitos eletrofílicos podem estimular a apoptose pela captura de tióis, aumento da concentração de cálcio e ativação das enzimas transglutaminase e endonuclease dependentes de cálcio (Fau *et al.*, 1997; Veiga Jr *et al.*, 2005).

Em países como a Inglaterra, o têucrío era constantemente utilizado, sem aviso aos consumidores, para substituir extratos de escutelária (*Scutellaria lateriflora*) em associações com valeriana. A mistura tóxica levou erroneamente à crença de que tanto a valeriana quanto a escutelária poderiam ser tóxicas quando em misturas, por efeito sinérgico (Veiga Jr *et al.*, 2005).

Outro caso importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L.). Esta planta é utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcalóides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (Buckel, 2007; Veiga Jr *et al.*, 2005). Após diversos casos de morte

ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por estes alcalóides, o uso interno do confrei foi condenado pela OMS.

Outras plantas medicinais são potencialmente perigosas, podendo-se citar as espécies do gênero *Senecio* (Buckel, 2007; Veiga Jr *et al.*, 2005), a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) e arnica (*Arnica montana* L.), que podem causar irritação gastrointestinal; o mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a trombeteira (*Datura suaveolens* Humb. & Bopl ex Willd.), que podem lesionar o sistema nervoso central; o cambará (*Lantana câmara* L.), conhecido por sua hepatotoxicidade; a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC), que causa distúrbios gastro-intestinais (como diarreia grave) e a arruda (*Ruta graveolens*), que pode provocar aborto, fortes hemorragias, irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas. Em doses elevadas, até mesmo o jatobá (*Hymenaea courbail* L.), conhecido como expectorante e fortificante, pode desencadear reações alérgicas, e a sucúuba (*Himathantus sucuuba* (Spruve) Woodson), usada no combate à amebíase, úlcera e gastrite, pode ser abortiva (Secco, 1990; Veiga Jr *et al.*, 2005). No caso de gestantes, o uso de espécies vegetais deve seguir rigorosamente os mesmos cuidados dos medicamentos alopáticos.

Entre as plantas medicinais que podem causar riscos para mulheres grávidas, por estimular a motilidade uterina e provocar aborto, encontram-se alho (*Allium sativum*), aloe (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphitum officinalis*), eucalipto (*Eucaliptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zengiber officinalis*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*).

Alguns óleos essenciais também devem ser evitados, como exemplo, os provenientes de bétula (*Betula alba*), cedro (*Cedrela brasiliensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), jasmim (*Jasminum officinalis*), manjericão (*Origanum basilicum*), manjerona (*Majorana hortensis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), rosa (*Rosa sp.*) e lavanda (*Lavanda angustifolia*). Neste último caso, deve-se evitar o consumo, especialmente nos primeiros meses de gravidez (Davis, 1996; Veiga Jr *et al.*, 2005).

A hipersensibilidade é um dos efeitos colaterais mais comuns causado pelo uso de plantas medicinais. Ela pode variar de uma dermatite temporária (comum, por exemplo, entre os fitoquímicos) até um choque anafilático. São muito comuns dermatites provocadas pelo contato com a planta. Esse efeito tem sido provocado, em grande parte,

por cosméticos que apresentam na sua formulação, extratos de plantas ou substâncias isoladas de fonte vegetal. Neste caso, não apenas os usuários como também os profissionais que manipulam os cosméticos, podem contrair dermatoses (Simões *et al.*, 1999; Veiga Jr *et al.*, 2005).

Muitas dermatites e reações alérgicas são causadas por tratamentos denominados de aromaterapia, uma prática que se popularizou ao longo da década de 1990, que envolve o uso de óleos essenciais concentrados. Como exemplos, podem-se citar os efeitos alérgicos da cânfora e de misturas contendo óleos de lavanda e jasmim (Schaller, *et al.*, 1995; Veiga Jr *et al.*, 2005).

#### 2.5.4 Plantas medicinais e atividade antimicrobiana

O uso de plantas como fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde, estando bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (Shale *et al.*, 1999). Muitas das plantas nativas dessas regiões ainda não foram estudadas e podem ser pesquisadas para ação antimicrobiana, em contraste com plantas da Europa, que já foram bastante estudadas.

As informações disponíveis sobre plantas medicinais ativas contra a levedura *C. albicans* não resultou, até o momento, em formulações para uso humano ou animal, exceto algumas patentes utilizando material derivado de plantas da família do *Allium* (Plummer, 1992), de *Radix gentianae* (Chen, 1996) e cinco extratos estudados por Lee *et al.* (2003).

Recentemente, vários grupos de pesquisadores de diferentes países têm estudado a inibição de *C. albicans* por extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas. Em muitos países, tais como Índia, e países da África e América Latina, a maioria dos trabalhos começa a partir de um levantamento etnofarmacológico, que descrevem as espécies mais freqüentes usadas pela população. Alguns países da América Latina têm mantido programas de pesquisa para triagem de plantas medicinais com atividade antimicrobiana, como é o caso de Cuba (Martínez *et al.*, 1996), Honduras (Lentz *et al.*, 1998) e México (Navarro *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 2001), além de regulamentarem através da criação de banco de dados para que haja uma preservação do conhecimento.

No Brasil, apesar da rica flora e biodiversidade existente, somente dados a partir de cerca de 44 espécies englobadas em 22 famílias com atividade positiva estão disponíveis, incluindo plantas nativas e exóticas (Duarte & Figueira, 2008 - Tabela1). Embora a maioria dos trabalhos refere-se a apresentações em congressos nacionais, o número de trabalhos desenvolvidos no Brasil, indexados ou não, é similar àqueles produzidos na América Latina e Ásia.

No Brasil, a maior parte das pesquisas refere-se a testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseadas em informações etnofarmacológicas, diferentemente dos trabalhos que enfocam a flora de uma dada região, onde várias famílias botânicas são estudadas. Um amplo estudo seria mais efetivo, principalmente se a investigação abrangesse o potencial farmacológico de espécies de um determinado gênero, guiado pelo uso popular, como o estudo desenvolvido por Silva & Cechinel (2002) para plantas do gênero *Bauhinia* spp. Os autores estudaram a composição química e farmacológica de 16 extratos contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Entretanto, nenhuma atividade foi encontrada contra *C. albicans*.

Extratos metanólicos obtidos a partir de espécies endêmicas de *Verbascum*, *Salvia* e *Stachys* foram testados por Dulger e Gonuz (2004) contra uma série de bactérias e leveduras, incluindo *C. albicans* ATCC 10231. Os extratos de *Verbascum gypsicola* apresentaram forte atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e as culturas de levedura. Os extratos de *Stachys* L. foram efetivos somente contra bactérias, enquanto os de *Salvia aytachii* demonstraram efeito antimicrobiano contra bactérias e contra as culturas de leveduras usadas no estudo.

Os autores confirmaram que extratos de *Verbascum gypsicola* e de *Sideritis brevidens* apresentaram forte atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e as culturas de leveduras estudadas

A atividade antimicrobiana e citotóxica de 18 flavonóides prenilados isolados das plantas medicinais *Morus alba* L., *M. mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.), *Sophora flavescens* Ait e *Echinosophora koreensis* Nakai foi estudada por Sohn et al. (2004) para bactérias e para as leveduras *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os flavonóides exibiram boa atividade antifúngica e forte atividade antibacteriana, sendo o broussochalcona A efetivo para *C. albicans*.

**Tabela 1.** Plantas medicinais com atividade anti-*Candida* estudadas no Brasil nos últimos dez anos, revisadas a partir de trabalhos indexados e não indexados.

Família e nome botânico	Parte da Planta <sup>a</sup>	Extrato , Óleo Essencial, Derivados <sup>b</sup>	Referências
<b>AMARANTACEAE</b>			
<i>Alternanthera maritima</i>	Ap	ae, et	Salvador et al., 2002
<i>Blutaparou portulacoides</i>	ap, rt	gl	Salvador et al., 2002
<b>ANACARDIACEAE</b>			
<i>Anacardium occidentale</i>	Lv	ns	Queiroz et al., 2000
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Lv	ha	Paiva et al., 2002.
<b>ANONACEAE</b>			
<i>Annona crassiflora</i>	Lv	et	Ferreira et al., 1998; Silva et al., 2001
<i>A. coriacea</i>	Lv	et	Ferreira et al., 1998; Silva et al., 2001
<b>ASTERACEAE</b>			
<i>Artemisia annua</i>	Ap	lseq	Foglio et al., 2002
<i>Calea serrata</i>	Lv	eo	Flach et al., 2000
<i>Conyza bonariensis</i>	n.s.	eo	Lima et al., 1994 <sup>§</sup>
<b>BORANGINACEAE</b>			
<i>Cordia nodosa</i>	Rt	ea, me	Costa et al., 2002a <sup>§</sup>
<b>BURSERACEAE</b>			
<i>Bursera simaruba</i>	Fr	eo	Savi et al., 1996
<i>Protium heptaphyllum</i>	Lv	eo	Lemos et al., 2002
<i>P. tenuifolium</i>	fr, re	eo	Lemos et al., 2002
<b>CHRYSOBALANACEAE</b>			
<i>Licania tomentosa</i>	lv, fr	he, me	Castilho et al., 2002
<b>EUPHORBIACEAE</b>			
<i>Croton</i> spp.	n.s.	eo	Cunha et al., 1994
<i>Croton nepetaefolius</i>	Lv	eo	Morais et al., 2002
<i>Phyllanthus sellowianus</i>	Ap	al	Cechinel Filho et al., 1994
<i>Sebastiania schottiana</i>	Lv	xa	Lima et al., 1994b
<b>FABACEAE</b>			
<i>Bowdichia virgilioides</i>	n.s.	eo	Lima et al., 1994 <sup>§</sup>
<i>Pithecellobium avaremotemo</i>	Lv	ns	Queiroz et al., 2000
<b>FLACOURTIACEAE</b>			
<i>Casearia sylvestris</i>	Lv	ae	Sato et al., 1996
<b>GUTTIFERAE</b>			
<i>Kielmeyera coriacea</i>	Ap	pl	Cortez et al. 1998
<b>LAMIACEAE</b>			
<i>Hyptis</i> sp.	n.s.	eo	Lima et al., 1994 <sup>§</sup>
<i>Mentha piperita</i>	Ap	eo	Santoratto et al., 2002 <sup>§</sup>
<i>Mentha</i> sp.	Lv	eo	Santos et al., 2000
<i>Ocimum gratissimum</i>	n.s.	eo	Lima et al., 1994 <sup>§</sup>
<i>O. gratissimum</i>	Ap	eo	Nakamura et al., 1996
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Lv	ns	Queiroz et al., 2000
<b>MALPIGHIACEAE</b>			
<i>Mascagnia rigida</i>	lv, rt	ch, ea, me	Costa et al. 2002b
<b>MONIMIACEAE</b>			
<i>Peumus boldus</i>	n.s.	eo	Lima et al., 1994 <sup>§</sup>
<b>MYRTACEAE</b>			
<i>Psidium</i> spp.	n.s.	eo	Cunha et al., 1994
<b>PIPERACEAE</b>			
<i>Piper cernuum</i>	Lv	eo	Constantin et al., 2001
<i>P. marginatum</i>	Lv	eo	Lima et al., 1996
<i>P. regnellii</i>	Lv	eo	Constantin et al., 2001
<b>POACEAE</b>			
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lv	eo	Santos et al., 2000
<b>PUNICACEAE</b>			
<i>Punica granatum</i>	Fr	ae	Lima et al., 2002
<i>P. granatum</i>	Fr	ns	Queiroz et al., 2000
<b>RUBIACEAE</b>			
<i>Borreria cupularia</i>	n.s.	eo	Lima et al., 1994 <sup>§</sup>
<i>Rubus rosaefolius</i>	Lv	ae, et	Mauro et al., 2000
<b>RUTACEAE</b>			
<i>Pilocarpus trachyllophus</i>	n.s.	eo	Melo et al., 1994
<b>SOLANACEAE</b>			
<i>Solanum grandiflorum</i>	Fr	et	Ferreira et al., 1998; Silva et al., 2001
<i>S. lycocarpum</i>	Fr	et	Ferreira et al., 1998; Silva et al., 2001
<b>VERBENACEAE</b>			
<i>Aloysia tryphila</i>	Ap	eo	Santoratto et al., 2002b
<i>Lippia sidoides</i>	Ap	eo, me, et, ae	Nunes et al., 1998

lv, folhas; fr, frutos; rt, raiz; ap, partes aéreas.

<sup>b</sup> **Extratos:** aq, aquoso; ha, hidroalcoólico; me, metanólico; ch, ciclohexânico; ea, acetato de etila; pl, polar. **Óleo:** eo, óleo essencial. **Derivados:** lseq, lactonas sesquiterpênicas; gl, glicosídeos; xa, xantoxilina. **Outros:** re, resinas; al, alcalóides.n.s., não especificado.

**Fonte:** Duarte e Figueira, 2008.

O efeito inibitório in vitro de extrato etanólico da folha de *Streblus asper* (SAE) sobre a adesão de *C. albicans* às células epiteliais humanas da mucosa oral (HBEC) foi investigado por Taweechaisupapong et al. (2005). A concentração mínima inibitória que reduziu significativamente a aderência após 1 h de exposição foi 15,6 mg/mL. Entretanto, houve uma significativa redução da adesão a HBEC após 1 min de exposição a 125 mg/mL do extrato. Concentrações de SAE de 125 e 250 mg/mL, também mostraram 41 e 61% de inibição da formação do tubo germinativo, respectivamente. Esses achados podem indicar que concentrações sub-letais de SAE podem modular a colonização da mucosa oral pela *Candida* suprimindo assim o potencial invasivo do patógeno.

Duarte et al. (2005) investigaram óleos essenciais e extratos etanólicos obtidos de 35 plantas medicinais comumente usadas no Brasil para atividade anti-*C. albicans*. Os óleos essenciais de 13 plantas mostraram atividade anti-*Candida* incluindo *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon martinii*, *C. winterianus*, *Cyperus articulatus*, *C. rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *M. piperita*, *Mentha sp.*, *Mikania glomerata*, *Stachys byzantina* e *Solidago chilensis* com concentrações mínimas inibitórias de 0,25 a 2,0 mg/mL.

A atividade de extratos aquosos, etanólico, clorofórmico e etéres obtidos a partir de 10 plantas nativas de Bahraini utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, foi investigada para fungos filamentosos e leveduriformes (Mandeeel & Taha., 2005). A mais alta atividade foi exibida pelo extrato etanólico de *Cressa cretica* L. contra *Penicillium citrinum* (halo de inibição = 32,2 mm) seguido por *C. albicans* (halo de inibição = 25,7 mm). *Heliotropium curassavicum* L. também demonstrou marcado efeito inibitório contra os mesmos microrganismos.

Uma significativa atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Coriandrum sativum* e *Foeniculum vulgare*, contra dois micopatógenos, sendo uma espécie responsável por doenças no cultivo de cogumelos comestíveis, 27 espécies de bactérias fitopatogênicas, *Escherichia coli* e *Bacillus magaterium* foi observada por Lo Cantore et al. (2004). A avaliação foi feita por testes de difusão em ágar mostrando que os dois óleos avaliados possuem alto efeito antimicrobiano, podendo ser usado como bactericida natural para controle de doenças de plantas provocadas por tais microrganismos.

Delaquis et al. (2002) estudaram a concentração mínima inibitória (MIC) de óleos essenciais sobre bactérias Gram (+) e Gram (-) e sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os óleos essenciais de *Anethum graveolens* L., *Eucalyptus dives* e sementes

e folhas de *C. sativum* foram obtidos por destilação, fracionados e analisados por cromatografia gasosa. Os óleos essenciais das sementes e folhas de *C. sativum* mostram-se efetivos contra *Pseudomonas fragi*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. cerevisiae* e principalmente contra *Listeria monocytogenes*, provavelmente pela presença de uma longa cadeia carbônica (C6 – C10), e compostos voláteis derivados de álcoois e aldeídos, identificados como linalol, octanol, 1 – decanol, (Z) – 3 – hexen – 1 – ol, (E) – 2 – decen – 1 – ol, decanal e (E) – 2 – decenal, respectivamente. Também foi identificada a presença de terpenos em grande abundância nos óleos essenciais de *C. sativum*, *E. dives* e *A. graveolens*. No óleo essencial das sementes de *C. sativum* foram detectados componentes que incluem álcoois, aldeídos, alcanos e terpenos. O composto encontrado em maior concentração foi o linalol (25,6%). As frações obtidas a partir do óleo essencial das sementes mostraram-se muito mais potentes que o próprio óleo bruto. A fração 1 possui uma mistura de alfa-pineno (89,4%) e camphona (8,50%), que inibiu fortemente os microrganismos, particularmente a levedura. Já a fração 2 foi pouco potente, porém efetiva contra todas as linhagens estudadas, pois a referida fração possui uma alta concentração de linalol (92,9%). As frações 4 e 5 obtidas das folhas do coentro possuem composição química e efetividade antimicrobiana similar às frações 1 e 2 proveniente das sementes. Inicialmente, os autores relacionaram a forte atividade antimicrobiana com compostos fenólicos presentes nas plantas, porém verificaram que várias frações eram deficientes nesses compostos, levando a conclusão de que a forte atividade foi promovida pelas outras substâncias presentes no óleo essencial.

Baicaleina (BE), o componente principal da *Scutellaria baicalensis*, tem sido amplamente estudada e relatada por mostrar uma gama de atividades biológicas (Di Carlo *et al.*, 1999, Shao *et al.*, 2002). Sua influência sobre a formação de biofilme de *C. albicans* ainda não foi totalmente caracterizada, porém foi capaz de diminuir drasticamente a formação do biofilme por *C. albicans* (Baillie & Douglas, 1999, Chandra *et al.*, 2001).

Devido à grande biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda por produtos naturais, por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona a investigação científica e a busca por fitofármacos. Esta sequência de eventos resultou em uma legislação “sui generis” com relação à biodiversidade e o conhecimento tradicional associado, que está agora sendo colocada em prática (Duarte e Figueira, 2008).

### 2.5.5 Plantas medicinais e a busca de novos medicamentos

Ao longo da história da humanidade, produtos naturais têm sido investigados e utilizados como matéria prima para tratamentos de doenças. No início do século 20, antes da “Era Sintética”, 80% dos medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas. Em tempos atuais os produtos naturais continuam sendo fontes significantes de drogas. Considerando-se a existência de aproximadamente 300 mil espécies de plantas superiores, apenas uma pequena porcentagem, estimada em 10 mil espécies, tem seu uso medicinal documentado (McChesney *et al.*, 2007). Dentre as famílias botânicas existentes, no presente estudo algumas espécies foram selecionadas levando-se em conta o aspecto etnobotânico e seus potenciais antimicrobianos.

*Liliaceae* é uma família de plantas da ordem Liliales que inclui 635 espécies de *Liliaceae* distribuídas em 39 gêneros. Na nova classificação, vários gêneros foram realocados em outras ou em novas famílias. Dentro dessa família encontramos o *Allium sativum* ou *Allium ramosum* também conhecido popularmente como nirá ou cebolinho chinês. É uma planta herbácea pertencente ao gênero *Allium*, ao qual pertencem também, por exemplo, o alho e a cebola. É cultivada pelo homem, sendo suas folhas muito utilizadas na culinária, sobretudo na Ásia, continente de onde é originária. A sua variante cultivada é normalmente designada por *Allium tuberosum*, enquanto que a variante selvagem é normalmente designada por *A. ramosum*. Existem referências antigas a esta planta que a designam como *A. Odorum* hoje considerado um sinônimo de *A. ramosum*. Alguns botânicos colocam tanto a variante cultivada como a selvagem na designação *A. ramosum*, por existirem diversas variantes intermediárias. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

O cebolinho chinês ou nirá (*Allium tuberosum*) é uma planta bolbosa, podendo atingir cerca de 70cm de altura. As suas folhas são verdes e estreitas. A sua inflorescência consiste numa umbela de flores brancas em forma de estrela. A multiplicação desta planta é feita através de sementeira, quer no outono, quer no início da primavera. A colheita acontece normalmente alguns meses após a plantação. As folhas de cebolinho chinês suportam bem o congelamento. O cebolinho da china é muito usado na culinária asiática, possuindo um sabor mais próximo do alho do que do cebolinho, apesar de ser consideravelmente mais suave. Tanto as folhas como o caule são usados como tempero, à semelhança do cebolinho ou do alho. Na China, é normalmente usado

na confecção de raviolis em conjunto com ovo, camarão e carne de porco. As flores podem também ser usadas como uma especiaria. No Vietinã, as folhas de cebolinho chinês são cortadas em pedaços pequenos e usadas como o único vegetal em sopas de caldo com rim de porco. É também bastante usado na culinária da Coréia, em pratos como o *buchukimchi* ou o *buchjeon*, panquecas de cebolinho chinês. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

*Apiaceae* é uma família de plantas angiospérmicas (plantas com flor - divisão Magnoliophyta), pertencente à ordem Apiales. Anteriormente conhecida como *Umbelliferae* (ambos os nomes são autorizados pelo ICBN) e vernaculizado para umbelífera, esta é uma família composta por plantas normalmente aromáticas e de caule oco. Inclui espécies como a salsa, a cenoura e outros parentes. Possui cerca de 300 gêneros, contendo mais de 3000 espécies. As flores são pequenas e possuem simetria radial com 5 sépalas, 5 pétalas e 5 estames. Estão dispostas numa inflorescência em forma de *umbela*, daí o seu anterior nome de *Umbelliferae*. Várias espécies possuem inflorescências onde as flores apresentam dimorfismo, possuindo as mais externas, pétalas mais vistosas destinadas à atração dos insetos, enquanto as mais internas são mais discretas, concentrando-se na reprodução. A família contém algumas espécies altamente tóxicas, como as espécies do gênero *Conium*, também conhecido como cicuta. Esta planta foi utilizada para executar Sócrates e também como veneno na ponta de setas. Contém também algumas plantas muito úteis na culinária, tais como a *cenoura*, a *salsa*, o *aipo* e o *funcho*. As *Apiaceae* são parentes próximas da família *Araliaceae*, sendo que as fronteiras entre estas duas famílias permanecem atenuadas. Alguns sistemas de classificação recentes colocam as *Araliaceae* numa família *Apiaceae* expandida, mas esta classificação não tem sido reconhecida. Os gêneros *Hydrocotyle* e *Trachymene*, tradicionalmente incluídos nas *Apiaceae*, são atualmente inseridos, de uma forma geral, na família *Araliaceae*. Entre os membros mais notáveis incluem-se: *Anethum graveolens* - Endro; *Anthriscus cerefolium* - Cerefólio; *Apium graveolens* - Aipo; *Conium maculatum* - Cicuta; *Coriandrum sativum* - Coentro; *Cuminum cyminum* - Cominho, *Daucus carota* - Cenoura; *Foeniculum vulgare* - Funcho ou erva-doce; *Pastinaca sativa* - Cherívia; *Petroselinum crispum* - Salsa; *Pimpinella anisum* - Anis. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Coentro, *Coriandrum sativum* (do latim *coriandrum*, pelo grego *koríandron*) é uma planta glabra, da família das umbelíferas, de flores róseas ou alvas, pequenas e

aromáticas, cujo fruto é diaquênio, e cuja folha, usada como tempero ou condimento, exala odor característico. O coentro é muito utilizado na culinária brasileira nordestina e, em Portugal, na cozinha alentejana e noutras regiões do sul do País (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Originário do sul da Europa e do Oriente Médio, o coentro já era conhecido e utilizado pelos egípcios, não como tempero, mas como planta medicinal, pois a ele se atribuíam propriedades digestivas, calmantes, anti-térmica, antimicrobiana e, quando usado externamente, para alívio de dores das articulações e reumatismos (Proença, 2007).

As gramíneas (R.Br.) Barnhart também conhecidas como capins, gramas (português brasileiro) ou relvas (português europeu) são plantas floríferas, monocotiledôneas (classe Liliopsida) da família Poaceae. Estima-se que pastos e savanas compreendem 20% da vegetação que cobre a Terra. No Brasil, ocorrem cerca de 180 gêneros e 1500 espécies. Esta família botânica é a mais importante economicamente de todas as famílias de plantas, incluindo forrageiras. Os grãos são o principal alimento cultivado em torno do mundo, e o bambu, usado extensamente para a construção em toda Ásia. As gramas agrícolas cultivadas para a produção de alimento são chamadas cereais. Os cereais constituem a fonte principal de calorias para os seres humanos, e incluem o arroz na Ásia, milho no México, trigo e cevada na Europa e América do Norte. O milho e outros cereais são também cultivados em muitos países para a alimentação animal. As gramíneas mais conhecidas são trigo, centeio, cevada, aveia, arroz, sorgo, milho, cana-de-açúcar e bambu. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

As folhas das gramíneas são enfileiradas, alongadas, paralelinérvias, invaginantes, com bainha abarcante fendida. Há duas pequenas expansões na base da lâmina foliar denominada aurículas. Na junção da lâmina foliar com a bainha há a formação da lígula que pode ser membranosa, pilosa ou mista, característica muito importante para a taxonomia. A epiderme é rica em silício (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

As flores das gramíneas são compostas por androceu com 3 estames de anteras grandes, versáteis e de filetes delgados e gineceu de ovário súpero, unilocular, uniovulado, revestido por dois estigmas plumosos (indícios de polinização anemófila). Na sua grande maioria, os frutos das gramíneas são cariópses. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

*Cymbopogon* é um gênero botânico pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae. Neste gênero encontram-se a citronela, a palmarosa e o capim-limão, sendo o gênero composto por aproximadamente 155 espécies ocorrendo na Europa, África, Ásia, Australásia, Pacífico, América do Norte e América do Sul.

Uma planta da família dos capins é a palmarosa (*Cymbopogon martinii*), que por possuir geraniol em seu óleo tem um aroma que lembra o do gerânio ou da rosa. A palmarosa é muito empregada no tratamento da pele, pois ajuda a tratar de acne e inflamações, age como rejuvenescedora e citofilática e, por isso, é muito usada na indústria cosmética. Um óleo muito parecido com a palmarosa é a jamrosa (*C. jawarancusa*), muito comum na Índia, mas ainda pouco conhecida no ocidente. A jamrosa possui um aroma e composição química similares à da palmarosa e por isso pode substituí-la em seus usos. O capim-gengibre (*C. martinii* var. *sofia*), um parente próximo da palmarosa, possui aroma totalmente diferente e de um tom mais rústico. Possui propriedades parecidas com as do capim-limão e age como um bom analgésico muscular, no alívio de tensão e dores (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Outra planta da família dos capins é a citronela (*C. winterianus*) uma planta aromática que ficou muito conhecida por fornecer o óleo essencial como matéria-prima para a fabricação de repelentes contra mosquitos e borrachudos. Considerado um ótimo repelente, o óleo da citronela é rico em geraniol e citronelal (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Cultivando-se a citronela em jardins é possível usufruir de seu poder repelente mas, para isso, é necessário cultivá-la na direção do caminho percorrido pelo vento, de modo que seu aroma seja levado até o local onde se deseja manter os mosquitos afastados.

Uma outra forma de aproveitar o poder repelente da planta é fazer um extrato aquoso com suas folhas e usá-lo para limpezas em geral.

No mercado, podemos encontrar vários produtos fabricados com óleo de citronela, entre eles, velas, loções e óleos utilizados como repelentes, principalmente em regiões litorâneas, onde há grande incidência de mosquitos e borrachudos. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Em uma pesquisa laboratorial, o óleo de citronela associado a 5% de vanilina, foi capaz de repelir três espécies de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Culex quin-quefasciatus* e *Anopheles*) por mais de 8 horas. Velas de citronela com 3% de óleo essencial e incensos

a 5% foram eficazes contra o *A. aegypti*, mosquito causador da dengue. Coleiras com citronela também têm se mostrado muito úteis para repelir pulgas, carrapatos e mosquitos em cães. Um efeito tão bom quanto o cloro e menos prejudicial à saúde é a utilização dos óleos essenciais dos capins como antisépticos para lavar pias de cozinha, tábuas de carne e ainda algumas gotas na água onde legumes e frutas são deixados por alguns minutos para matar vermes e bactérias. (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

O método industrial de extração do óleo essencial da citronela é conhecido como "arraste de vapor", onde as folhas são colocadas em um recipiente e passam a receber vapor d'água constantemente. A água, aquecida em uma caldeira, causa arraste de vapor que ao passar pelas folhas da citronela, leva junto o óleo essencial, que em seguida é separado da água por condensação. Já a extração caseira do óleo essencial da citronela, segundo informações da Seção de Plantas Aromáticas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) deve ser realizada colocando-se as folhas com um pouco de água numa panela de pressão, e o vapor exalado também conterá óleo essencial, o qual será difícil ser recolhido (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

O óleo essencial da citronela pode ser liberado mais facilmente se o misturarmos suas folhas ao álcool, uma vez que esse óleo é solúvel neste solvente. Porém, outras substâncias presentes na folha, como clorofila e pigmentos, também são solúveis em álcool e, neste caso, não se obtém o óleo puro como aquele extraído por meio do vapor d'água.

É muito comum a confusão entre capim-limão (*C. citratus*) e a citronela, devido a semelhança morfológica das mesmas. Pode-se diferenciá-las através do aroma pois, o capim-limão apresenta um cheiro mais suave, que lembra o limão enquanto, o aroma da citronela é bem intenso.

Asteraceae é a família botânica com o maior número de espécies entre as Magnoliophytas, sendo também conhecida por Compositae ou compostas. Existem aproximadamente 50.000 espécies divididas em 900 gêneros, Muitas das quais são utilizadas para o cultivo devido ao seu valor biológico; entre os representantes desta família estão o absinto (*Artemisia absinthium*) o alface (*Lactuca sativa.*), o girassol (*Helianthus annus*), o crisântemo (*Chrysanthemum* sp.), a margarida (*Bellis perenis*), a santolina (*Santolina chamaecyparissus*) dentre outras. As asteráceas encontram-se em

regiões tropicais, subtropicais e temperadas, vegetando nos mais diversos *habitats* (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Santolina é o gênero de plantas originário do baixo mediterrâneo. Apresenta folhagem recortada nas cores cinza, verde acinzentado ou verde. Suas folhas são aromáticas, apresentando um aroma intenso que lembra a camomila (*S. chamaecyparissus*). Existe alguma confusão na nomenclatura de algumas santolinas, no que diz respeito à variedade *neapolitana* que, na maioria das vezes é referida como pertencente à espécie *pinnata*, mas por vezes referida também como pertencendo à espécie *chamaecyparissus*. A *S. virens* aparece referida como sendo sinônimo de *S. viridis* e *S. rosmarinifolia*, sendo outras vezes referida como espécie diferente. A dimensão da planta é variável entre as espécies e variedades, apresentando normalmente entre 30 e 50 cm (Bremness, 1993).

Originárias de solos pobres são pouco exigentes em fertilização, não se desenvolvendo bem em solos demasiado ricos, sendo a *S. viridis* a mais exigente de todas. Necessitam de solos bem drenados, de preferência arenosos, embora tolerem razoavelmente bem os argilosos. Devem ser expostas ao sol e toleram geadas fortes. As santolinas necessitam apenas de uma fertilização ligeira na primavera, pois o excesso de fertilizantes provocará um crescimento demasiado. Ainda, deve-se evitar a companhia de plantas exigentes para não partilhar seus nutrientes.

A *Santolina chamaecyparissus* é também conhecida como santolina ou camomila de manhón e suas folhas e flores são utilizadas para obtenção de fitofármacos. É indicada como vermífugo, repelente, antimicrobiano e para distúrbios estomacais (Bremness, 1989; Bremness, 1993; Proença, 2007).

Justificam-se estudos pela busca de novos componentes bioativos a partir de extratos vegetais e óleos essenciais de plantas medicinais, cuja importância tem sido objetivo de inúmeros relatos na literatura, particularmente contra a formação do biofilme com a presença de espécies de *Candida*. Pesquisas visam detectar a sensibilidade dos microrganismos as drogas uma vez que, o percentual de leveduras sensibilidade dose dependente e ou resistentes é bastante significativo. Nesse sentido a implantação de um programa para desenvolvimento de testes de sensibilidade, para que haja monitoramento de amostras clínicas, adequando-se a melhor droga e a dose ideal a ser usada para cada paciente torna-se necessária, evitando-se assim dose excessiva e indução de resistência microbiana. Portanto, estudos que venham a contribuir para um maior entendimento das

relações entre os microrganismos e antimicrobianos deverão ser levados a efeito no sentido de se elucidar os complexos mecanismos que envolvem a resistência microbiana a drogas, bem como a busca de medicamentos a partir de novas fontes fazem parte do escopo dessa pesquisa.

Com base na literatura pertinente este estudo teve como proposta:

- estudar o desenvolvimento *in vitro* do biofilme de *Candida* spp. proveniente de amostras clínicas obtidas da cavidade oral de pacientes adultos portadores de doença periodontal.

- avaliar a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e frações de algumas plantas medicinais pertencentes à CPMA - Coleção de Germoplasmas do CPQBA/UNICAMP, contra biofilmes das linhagens de *Candida* spp, através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC).

- identificar as classes de substâncias presentes nos óleos essenciais e/ou extratos vegetais das plantas medicinais e suas frações que apresentarem melhor atividade antifúngica.

- detectar a ocorrência de mudanças ou danos na morfologia das células do biofilme e/ou nas células de *Candida* spp quando submetidas aos materiais vegetais, através da observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## METODOLOGIA

### 4.1 Plantas Mediciniais

As plantas medicinais selecionadas para o estudo no presente trabalho pertencem à CPMA coleção de Plantas Mediciniais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP, sendo as espécies adaptadas à nossa região, com indicação de atividade anti-*Candida*. Testes preliminares foram realizados entre uma variedade de espécies de plantas medicinais com a finalidade de se escolher plantas cujos óleos essenciais e extratos vegetais apresentassem bom desempenho de atividade anti-*Candida*. Dentre as plantas investigadas foram selecionadas aquelas, cujos óleos essenciais e extratos vegetais apresentaram os melhores resultados para atividade antifúngica (Tabela 2). Durante o estudo, as plantas foram avaliadas quanto à fase de desenvolvimento e época adequada para colheita. Foram utilizadas amostras das partes aéreas das plantas frescas para obtenção dos óleos essenciais e das plantas secas e moídas para obtenção dos extratos diclorometânico e hexânico. A secagem das plantas foi feita à 40 °C, em estufa com circulação de ar, até que estas apresentassem peso constante.

**Tabela 2.** Plantas medicinais da coleção de Germoplasmas do CPQBA/UNICAMP estudadas (OE = óleo essencial; EH = extrato hexânico; ED = extrato diclorometânico).

Planta Medicinal	Família	Nome Popular	No. CPMA	Preparo
<i>Allium tuberosum</i> Rottl. ex Spreng.	Liliaceae	nirá	653	OE; ED
<i>Coriandrum sativum</i> L	Apiaceae	coentro	664	OE; EH
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) J. F. Watson	Poaceae	palmarosa	354	OE; ED
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt.	Poaceae	citronella	712	OE; ED
<i>Santolina chamaecyparissus</i>	Asteraceae	Santolina	1812	OE; ED

#### 4.1.1 Determinação do teor de umidade das plantas medicinais

O teor de umidade das plantas foi determinado após secagem em estufa à 105 °C durante 24 horas. Este foi utilizado nos cálculos de rendimento em extrato das plantas medicinais.

#### **4.1.2 Obtenção dos óleos essenciais das plantas**

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se cerca de 100 g das partes aéreas da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, adicionando-se 700 mL de água destilada e procedendo-se à destilação, a temperatura de ebulição da água, por 3 horas. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e a fase orgânica obtida submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada sob algodão e o solvente evaporado à secura.

#### **4.1.3 Obtenção dos extratos das plantas**

Os extratos hexânico e diclorometânicos foram obtidos a partir da extração de 10 gramas das plantas secas a 40 °C e moídas com 150 mL de hexano ou diclorometano, seguido de agitação a 200 rpm em agitador tipo mesa rotatória, à temperatura ambiente, durante 3 horas. Após este período, o material foi filtrado e o resíduo da planta re-extraído com a mesma quantidade de solvente. O extrato obtido foi filtrado e o resíduo lavado com 50 mL de solvente. Os filtrados combinados foram então evaporados a vácuo até a secura, obtendo-se assim os extratos das plantas.

#### **4.1.4 Fracionamento dos óleos essenciais e extratos de melhor atividade em coluna seca**

As colunas secas foram preparadas com sílica gel 60 Merck (0,063 – 0,200mm), utilizando-se como suporte tripa de celulose de 3 cm de diâmetro e 1,0 g dos extratos secos. As colunas foram empacotadas até 20 cm de altura, seguido da adição da papa preparada com o extrato. No caso dos óleos essenciais, estes foram adicionados diretamente na coluna empacotada, e em seguida eluídos. A fase móvel utilizada em cada coluna foi definida após análise dos óleos essenciais e extratos por Cromatografia em Camada Delgada, em diferentes eluentes.

Após eluição, as colunas foram divididas em 4 ou 5 partes e as frações transferidas individualmente para frascos adequados, seguido da adição de acetato de etila e analisadas por CCD (Eluente –diclorometano; Revelador - solução de anisaldeído), e em

seguida, as frações semelhantes foram agrupadas e filtradas à vácuo, extraindo-se os resíduos das sílicas com acetato de etila.

#### **4.1.5 Análise do óleo de *C. sativum* por cromatografia em camada delgada**

A identificação das classes de substâncias presentes no óleo essencial de *C. sativum* e suas frações foi feita por cromatografia em camada delgada.

#### **4.1.6 Análise dos óleos, extratos e frações de melhor atividade por CG-EM**

A identificação dos constituintes dos óleos, extratos e frações que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana foi feita em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 5890 Série II, equipado com detetor seletivo de massas Hewlett-Packard 5971, injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar HP-5 (25m x 0,2 mm x 0,33 µm). Temperaturas: injetor = 220 °C, detetor = 280 °C, coluna = 60 °C, 3°C.min<sup>-1</sup>, 240 °C (7 min). Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Após a análise e identificação dos compostos de melhor atividade antimicrobiana adquirimos os compostos bioativos padrão (Sigma-Aldrich®) para realização dos testes antimicrobianos.

#### **4.2 Meios de cultura**

O meio utilizado para a o para manutenção das leveduras foi o Ágar Sabouraud Dextrose (g/L): peptona, 10,0; glicose, 40,0; ágar-ágar, 15,0.

Para os testes de atividade antimicrobiana foi utilizado o meio para RPMI – 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA).

### 4.3 Leveduras: cepas de referência e isolados clínicos

#### 4.3.1 Cepas de referência

Para o desenvolvimento da presente pesquisa foram utilizadas cepas de referência de diversas espécies de *Candida* spp., obtidas através da coleção Holandesa CBS (Quadro 1).

**Quadro 1-** Cepas de referência de *Candida* spp.

CEPAS-CBS	ESPÉCIES
CBS-562	<i>C. albicans</i>
CBS-7987	<i>C. dubliniensis</i>
CBS-573	<i>C. krusei</i>
CBS-94	<i>C. tropicalis</i>
CBS-604	<i>C. parapsilosis</i>

#### 4.3.2 Isolados clínicos

Os isolados clínicos utilizados neste estudo foram originários de voluntários selecionados na clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP, sob autorização do Comitê de Ética em Pesquisa (008/2003), coletados da mucosa oral, bolsa periodontal e identificados através do cultivo em meio cromogênico CHROMagar-*Candida* e por testes morfológicos e bioquímicos de fermentação e assimilação de carboidratos (Quadro 2). Posteriormente, foram armazenados a -70°C em meio YPD-Glicerol a 15% na Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP.

**Quadro 2-** Isolados clínicos de pacientes portadores de doença periodontal e sistemicamente saudáveis

Idade	Código das amostras	Espécie	Comitê ética
30 a 60 anos	3A5, 13A5, 41M2, 50M2	<i>C. albicans</i>	008/2003
30 a 60 anos	56M3, 56M4, 56M6	<i>C. krusei</i>	008/2003
30 a 60 anos	45M2, 45M4, 45M5	<i>C. parapsilosis</i>	008/2003
30 a 60 anos	53M6, 53M7, 53M8	<i>C. tropicalis</i>	008/2003
30 a 60 anos	26A2, 26A3, 26A4	<i>C. dubliniensis</i>	008/2003

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: (A) - bolsa periodontal ou (M) mucosa bucal. Número de voluntários = 10

#### 4.4 Preparo de inóculo

O inóculo foi preparado em solução salina, comparando-se a turbidez com a escala Mc Farland (0,5), equivalente a uma absorbância de 0,08 a 0,10 a 625 nm e a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL.

A suspensão celular contendo  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL foi diluída da seguinte maneira:

- (a) tomando 1 mL e adicionando 9 mL de solução salina (0,9%) esterilizada. (Equivalente a  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL).
- (b) tomando 1 mL e adicionando 9 mL de solução salina (0,9%) esterilizada. (Equivalente a  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL).
- (c) tomando 1 mL e adicionando 4 mL de meio de cultura. (Equivalente a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL ou  $\times 10^2$  em 100  $\mu$ L). Usar 100  $\mu$ L para um volume final de 200  $\mu$ L.

#### **4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, óleos essenciais e frações pelo método da microdiluição (CLSI, 2002) – células planctônicas.**

Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços, foram depositados 100 µL de caldo RPMI - 1640, com exceção da coluna 12, utilizada para os controles. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL do extrato ou óleo essencial testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna). Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a se obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, 100 µL de uma suspensão da levedura *C. albicans* de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland nº 0,5 e diluídos para concentração final de  $10^4$  células/mL foram adicionados. As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 h à 37 °C. Após este período foram acrescentados 20 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) à 0,5%, e a placa re-incubada por 3 horas na referida temperatura. A MIC foi definida como a menor concentração do extrato ou óleo capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, ou seja, capaz de inibir o crescimento leveduriforme.

Foram incluídos nos testes os antifúngicos fluconazol (Sigma-Aldrich®) e nistatina (Sigma-Aldrich®), como controle para comparação da atividade antimicrobiana dos materiais vegetais testados. Para verificar a esterilidade do meio de cultura e controle do crescimento do microrganismo, bem como, dos materiais vegetais testados os mesmos eram colocados individualizados nas placas de Elisa.

#### **4.6 Formação do biofilme**

Os biofilmes foram produzidos em placas esterilizadas de polietileno de 96 poços, não tratadas (TPP). Inicialmente, 100 µl de uma suspensão contendo  $10^7$  células/mL foram transferidos para cada poço da placa com auxílio de um pipetador multicanal. Em seguida a placa foi incubada por 1,5 h a 37 °C sob agitação de 75 rpm, permitindo que a levedura ficasse aderida ao fundo dos poços. Como grupo controle, 3 poços de cada placa foram manuseados seguindo a mesma metodologia, sem a adição da suspensão de

células. Após a fase de adesão, a suspensão foi aspirada de cada poço e a placa lavada duas vezes com 150 µl de tampão salina fosfatada (PBS), para remoção das células não aderidas. Um total de 100 µl do meio RPMI-1640 foram transferidos para cada poço e a placa incubada a 37 °C, sob agitação de 75 rpm, durante 24 h.

A formação do biofilme foi quantificada com solução de cristal violeta, de acordo com Djordjevic *et al.* (2002). Todos os testes foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

#### **4.6.1 Quantificação do biofilme com solução de Cristal Violeta (0,4%), de acordo com Djordjevic *et al.* (2002).**

Previamente, o biofilme desenvolvido em cada poço foi lavado duas vezes com 200 µl de PBS e secados ao ar por 45 min. Em cada poço foram acrescentados 110 µl de solução aquosa de cristal violeta a 0,4% por 45 min. Após realizarmos esse procedimento, os mesmos foram lavados 4 vezes com 350 µl de água destilada e imediatamente descorados com 250 µl de etanol a 95%. Após 45 minutos desse último procedimento, 100 µl da solução descorada foi transferida para um poço de uma nova placa e a quantidade do cristal violeta mensurada a 525 nm no leitor de Elisa (SpectraMax 340 Tunable Microplate Reader; Molecular Devices Ltda). Os valores de absorvância foram subtraídos dos valores de absorvância dos poços-controle de modo a avaliar a quantidade de biofilme formado.

#### **4.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, frações e compostos bioativos de *C. sativum* sobre a formação do biofilme de *Candida* spp.**

Para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de frações e compostos bioativos (Sigma-Aldrich®) de *C. sativum*, sobre a formação do biofilme de *Candida* spp. foram feitas aplicações do óleo a intervalos regulares durante 24 h, em duas diferentes concentrações, sendo estas, correspondente a MIC encontrada para a célula planctônica das leveduras, e 1 mg/mL. As aplicações de óleo essencial foram feitas antes da adesão das células planctônicas (Tzero), após a pré-adesão (T3 h) e após 6 h, 12 h, 18 h, 24 h e 42h. A leitura dos resultados foi efetuada no intervalo seguinte ao da aplicação. Foram

também incluídos nos testes os controles fluconazol (fungistático) - 0,064 mg/mL e nistatina (fungicida) - 1 mg/mL.

Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, cada um em triplicata.

#### **4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Células provenientes dos biofilmes das leveduras foram inoculadas em meio Sabouraud/Dextrose e incubadas por 18 h a 37 °C. Em seguida as células foram centrifugadas e a concentração ajustada com solução salina estéril 0,9%, para equivalente a 0,5 da escala McFarland. A cada 9 mL da suspensão foi acrescentado 1 mL do óleo de melhor atividade (*C. sativum*), em diferentes concentrações. A integridade da parede celular foi observada ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) nos intervalos de 30, 60 e 120 min, em lâminas lab-tek. Após os tempos pré-determinados, as suspensões de leveduras foram centrifugadas e lavadas com glutaraldeído a 3% (v/v) em tampão fosfato (pH 7.4), por duas vezes e 2 mL de glutaraldeído foram adicionados ao "pellet" que permaneceu a temperatura ambiente por 12h. Novamente as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células desidratadas com banhos seqüenciais de etanol, nas concentrações de 50%, 70%, 90% e etanol absoluto (2X). Após secagem por 30 min à temperatura ambiente, foi determinado o ponto crítico. Na seqüência foi feita metalização com ouro e as imagens observadas por MEV (5600LV).

## RESULTADOS

### 5.1 Atividade antimicrobiana das espécies medicinais frente às células planctônicas dos isolados de *Candida* spp.

Para estudo da atividade anti-*Candida* spp das plantas medicinais listadas na Tabela 2, as plantas foram obtidas a partir de coletas realizadas sempre pela manhã, no campo experimental do CPQBA / UNICAMP. Testes preliminares foram realizados entre uma variedade de espécies de plantas medicinais com a finalidade de se escolher plantas cujos óleos essenciais e extratos vegetais apresentassem bom desempenho de atividade anti-*Candida*. Dentre as plantas investigadas foram selecionadas aquelas, cujos óleos essenciais e extratos vegetais apresentaram os melhores resultados para atividade antifúngica (Tabela 2).

Os dados sobre as datas de coletas das plantas, massa da planta utilizada, rendimento em óleo essencial e teor de umidade estão apresentados na Tabela 3. As plantas medicinais foram também coletadas para obtenção de extrato diclorometano e hexânico, e os resultados referentes às datas das coletas, massa de planta utilizada, rendimento em extrato e teor de umidade estão listados nas Tabelas 4 e 5. Na Tabela 6 esta apresentado o rendimento em frações do óleo essencial de *C.sativum*.

Em seguida, os óleos essenciais (OE) e extratos diclorometânicos (ED) e hexânico (EH) foram testados para atividade frente às células planctônicas dos isolados de *Candida* spp. Os resultados de concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais e extratos vegetais estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 7 e 8. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da atividade anti-*Candida* do óleo essencial bruto e frações de *C.sativum*.

A Figura 1 expressa os resultados da cromatografia de camada delgada (CCD) do Óleo essencial de *C. sativum* e suas respectivas frações encontradas F1- F10, as quais foram agrupadas segundo a equivalência das bandas apresentadas na CCD.

Para comparar os resultados de atividade inibitória obtida a partir das plantas medicinais testadas foram escolhidos dois antifúngicos disponíveis comercialmente: a nistatina (poliênico - fungicida) e o fluconazol (azólico fungistático). Para tal investigação foram escolhidas todas as cepas padrões e apenas os isolados clínicos que mostraram maior desenvolvimento em biofilme (Figuras 2 a 6). Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 3.** Rendimento em óleo essencial (OE) das plantas medicinais estudadas

Planta Medicinal (OE)	Data da Coleta da Planta	Massa planta fresca (g)	Massa de Óleo (g)	Rendimento em óleo Base seca (%)	Rendimento em óleo Base fresca (%)	Teor de Umidade (%)
<i>A. tuberosum</i>	27/06/07	3235,04	0,2849	0,11	0,009	91,96
<i>C. sativum</i>	27/06/06	3580,00	0,2625	0,08	0,007	90,79
<i>C. martinii</i>	09/04/07	907,36	5,3421	1,36	0,590	56,57
<i>C. winterianus</i>	09/04/07	446,75	3,1295	1,88	0,700	62,74
<i>S. chamaecyparissus</i>	09/04/07	366,37	0,1310	0,15	0,036	76,32

**Tabela 4.** Rendimento em extrato diclorometânico (ED) das plantas medicinais estudadas

Planta Medicinal (ED)	Data da Coleta	Massa planta Seca (g)	Massa extrato Obtido (g)	Teor de Umidade %	Rendimento em extrato diclorometânico %
<i>A. tuberosum</i>	27/06/07	57,00	10,5527	81,50	18,50
<i>C. martinii</i>	29/11/06	70,35	5,1600	92,67	7,33
<i>C. winterianus</i>	29/11/06	41,08	6,0317	85,32	14,68
<i>S. chamaecyparissus</i>	09/04/07	72,00	7,3054	89,86	10,14

**Tabela 5.** Rendimento em extrato hexânico (EH) das plantas medicinais estudadas

Planta Medicinal (EH)	Data da Coleta	Massa da planta Seca (g)	Massa do extrato Obtido (g)	Teor de Umidade %	Rendimento em extrato hexânico %
<i>C. sativum</i>	29/11/06	250,00	0,3057	9,21%	1,33%

**Tabela 6.** Rendimento em frações do óleo essencial de *C. sativum* obtidas por coluna seca

Planta Medicinal (Frações)	Massa de óleo inicial (g)	Massa da fração 3 e 4 (mg)	Massa da fração 5 (mg)	Massa da fração 6 (mg)	Massa da fração 7 (mg)	Massa das frações 8, 9 e 10 (mg)
<i>C. sativum</i>	1,00	8,74	25,90	22,60	120,40	155,20

Tabela 7. Atividade anti-*Candida* (MIC – mg/mL) dos óleos essenciais das espécies medicinais estudadas

Espécies de <i>Candida</i>	Espécies Medicinais				
	A. <i>tuberosum</i>	C. <i>sativum</i>	C. <i>martinii</i>	C. <i>winterianus</i>	S. <i>chamaecyparissus</i>
<i>C. albicans</i> CBS 562	0,500	0,015	0,063	1,000	1,000
<i>C. albicans</i> 3 A5	0,500	0,015	0,250	1,000	1,000
<i>C. albicans</i> 13 A5	0,500	0,031	0,063	0,500	1,000
<i>C. albicans</i> 41 M2	0,500	0,031	0,063	1,000	1,000
<i>C. albicans</i> 50 M2	0,500	0,063	0,250	0,500	1,000
<i>C. krusei</i> CBS 573	*	0,015	0,063	0,063	0,500
<i>C. krusei</i> 56 M3	0,007	0,007	0,007	0,031	0,125
<i>C. krusei</i> 56 M4	1,000	0,007	0,007	0,007	0,007
<i>C. krusei</i> 56 M6	1,000	0,007	0,007	0,007	0,007
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	0,015	0,125	0,125	1,000	1,000
<i>C. parapsilosis</i> 45 M2	0,015	0,007	0,031	0,250	0,500
<i>C. parapsilosis</i> 45 M4	0,015	0,007	0,015	0,063	0,250
<i>C. parapsilosis</i> 45 M5	0,015	0,015	0,250	1,000	1,000
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	1,000	0,007	0,125	0,500	0,063
<i>C. dubliniensis</i> 26 A2	1,000	0,063	0,250	1,000	0,500
<i>C. dubliniensis</i> 26 A3	1,000	0,031	0,250	1,000	0,250
<i>C. dubliniensis</i> 26 A4	*	0,500	1,000	1,000	0,500
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	*	0,125	1,000	1,000	1,000
<i>C. tropicalis</i> 53 M6	*	0,125	*	*	1,000
<i>C. tropicalis</i> 53 M7	*	0,063	0,250	1,000	*
<i>C. tropicalis</i> 53 M8	*	0,031	*	*	*

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: (A) - bolsa periodontal ou (M) mucosa bucal.  
\* MIC >1,0 mg/mL

**Tabela 8.** Atividade anti-*Candida* (MIC - mg/mL) dos Extratos Diclorometânicos (ED) e Hexânico (EH) das espécies medicinais estudadas

Espécies de <i>Candida</i>	Espécies Medicinais				
	ED A.	EH C.	ED C.	ED C.	ED S.
	<i>tuberosum</i>	<i>sativum</i>	<i>martinii</i>	<i>winterianus</i>	<i>chamaecyparissus</i>
<i>C. albicans</i> CBS 562	0,500	0,125	0,250	0,125	0,250
<i>C. albicans</i> 3 A5	*	1,000	1,000	1,000	*
<i>C. albicans</i> 13 A5	*	1,000	1,000	1,000	*
<i>C. albicans</i> 41 M2	*	1,000	1,000	1,000	*
<i>C. albicans</i> 50 M2	*	1,000	1,000	1,000	*
<i>C. krusei</i> CBS 573	*	0,125	0,125	0,063	0,500
<i>C. krusei</i> 56 M3	*	0,031	0,063	0,002	0,063
<i>C. krusei</i> 56 M4	*	0,015	0,007	0,007	0,500
<i>C. krusei</i> 56 M6	*	0,002	0,007	0,007	0,015
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	0,015	0,031	0,063	0,125	1,000
<i>C. parapsilosis</i> 45 M2	*	0,063	0,063	0,250	0,125
<i>C. parapsilosis</i> 45 M4	*	0,125	0,031	0,063	0,125
<i>C. parapsilosis</i> 45 M5	*	0,007	1,000	0,063	1,000
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	*	0,031	0,250	0,125	0,063
<i>C. dubliniensis</i> 26 A2	*	0,250	0,500	0,500	0,500
<i>C. dubliniensis</i> 26 A3	*	0,250	0,500	0,250	0,500
<i>C. dubliniensis</i> 26 A4	*	0,250	0,250	0,250	1,000
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	*	0,500	1,000	1,000	1,000
<i>C. tropicalis</i> 53 M6	*	0,500	*	*	1,000
<i>C. tropicalis</i> 53 M7	*	0,250	0,250	1,000	*
<i>C. tropicalis</i> 53 M8	*	0,250	*	*	*

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: (A) - bolsa periodontal ou (M) mucosa bucal.  
\* MIC >1,0 mg/mL

Tabela 9. Atividade anti-*Candida* (MIC - mg/mL) do Óleo essencial(OE) e frações de *C.sativum*

Espécie de <i>Candida</i>	óleo bruto	Frações de Óleo Essencial de <i>C. sativum</i>				
		Fração 3 e 4	Fração 5	Fração 6	Fração 7	Fração 8-10
<i>C. albicans</i> CBS 562	0,015	0,063	*	0,500	0,125	0,015
<i>C. albicans</i> 13 A5	0,031	0,125	*	0,500	0,250	0,063
<i>C. krusei</i> CBS 573	0,015	0,500	0,500	0,250	0,125	0,063
<i>C. krusei</i> 56 M3	0,007	0,250	0,250	0,250	0,125	0,063
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	0,125	0,500	*	0,250	0,250	0,063
<i>C. parapsilosis</i> 45 M4	0,007	0,500	*	0,250	0,250	0,063
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	0,007	0,125	*	0,063	0,063	0,031
<i>C. dubliniensis</i> 26 A3	0,031	0,250	*	0,250	0,125	0,063
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	0,125	0,500	*	1,000	0,063	0,063
<i>C. tropicalis</i> 53 M7	0,063	*	*	1,000	0,250	0,125

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: (A) - bolsa periodontal ou (M) mucosa bucal.  
\* MIC >1,0 mg/mL

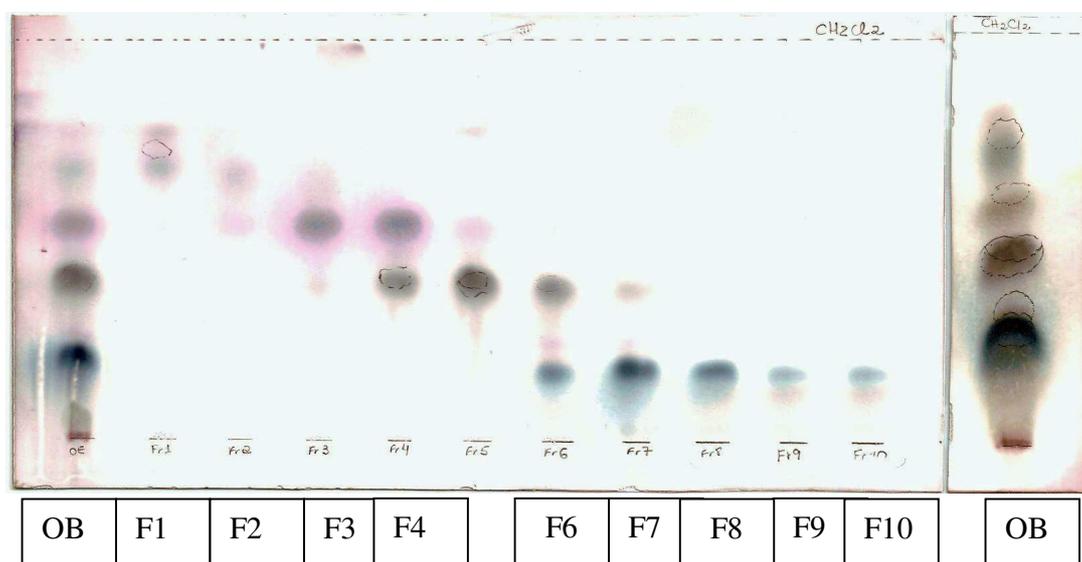


Figura 1: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do Óleo essencial de *C. sativum* e suas frações. OB= óleo bruto. F= Fração

Tabela 10. Atividade anti-*Candida* (MIC - mg/mL) do Fluconazol e Nistatina contra leveduras do gênero *Candida*

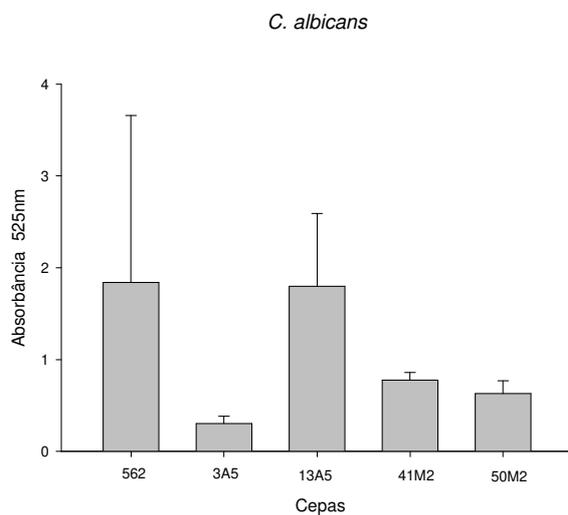
Espécie de <i>Candida</i>	MIC (mg/mL)	Massa molar (mM)	MIC (mg/mL)	Massa molar (mM)
	Fluconazol	Fluconazol	Nistatina	Nistatina
<i>C. albicans</i> CBS 562	0,002	0,0065	0,063	0,0680
<i>C. albicans</i> 3 A5	0,064	0,2091	0,063	0,0680
<i>C. albicans</i> 13 A5	0,032	0,1045	0,125	0,1350
<i>C. albicans</i> 41 M2	0,032	0,1045	0,125	0,1350
<i>C. albicans</i> 50 M2	0,032	0,1045	0,125	0,1350
<i>C. krusei</i> CBS 573	0,0005	0,0016	0,015	0,0162
<i>C. krusei</i> 56 M3	0,064	0,2091	0,015	0,0162
<i>C. krusei</i> 56 M4	0,064	0,2091	0,015	0,0162
<i>C. krusei</i> 56 M6	0,032	0,1045	0,015	0,0162
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	0,008	0,0261	0,007	0,0075
<i>C. parapsilosis</i> 45 M2	0,004	0,0130	0,007	0,0075
<i>C. parapsilosis</i> 45 M4	0,008	0,0261	0,007	0,0075
<i>C. parapsilosis</i> 45 M5	0,008	0,0261	0,250	0,2700
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	0,001	0,0032	0,007	0,0075
<i>C. dubliniensis</i> 26 A2	0,002	0,0065	0,007	0,0075
<i>C. dubliniensis</i> 26 A3	0,001	0,0032	0,007	0,0075
<i>C. dubliniensis</i> 26 A4	0,001	0,0032	0,007	0,0075
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	0,016	0,0522	0,125	0,1350
<i>C. tropicalis</i> 53 M6	0,016	0,0522	0,125	0,1350
<i>C. tropicalis</i> 53 M7	0,008	0,0261	0,125	0,1350
<i>C. tropicalis</i> 53 M8	0,008	0,0261	0,125	0,1350

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: (A) - bolsa periodontal ou (M) mucosa bucal.

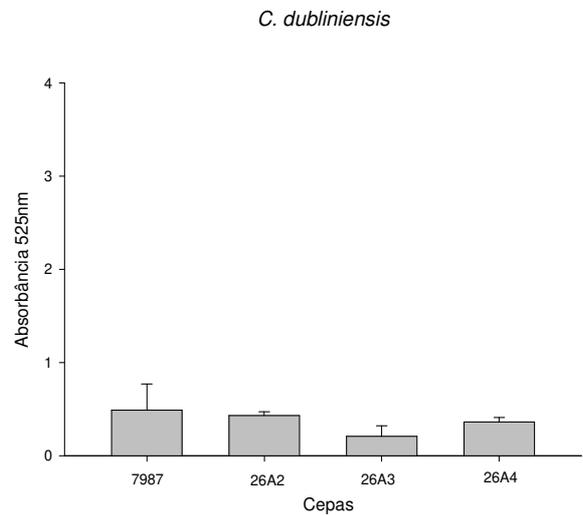
\* MIC >1,0 mg/mL. Massa molar do Fluconazol = 306/ Massa molar da Nistatina = 926.

## 5.2 Padrão de desenvolvimento de biofilme dos isolados de *Candida spp.*

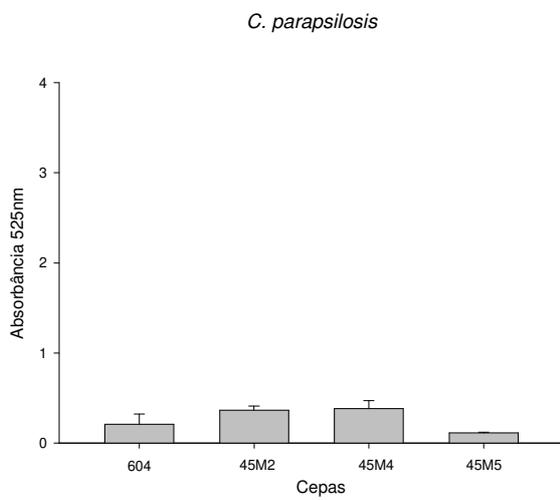
Concomitante aos testes de atividade com os óleos essenciais e extratos vegetais foi feito um ensaio com biofilme das espécies de *Candida* visando verificar o padrão de desenvolvimento dos mesmos. O padrão de desenvolvimento observado para os biofilmes após 24 h de incubação a 37 °C está representado nas Figuras 2 a 6.



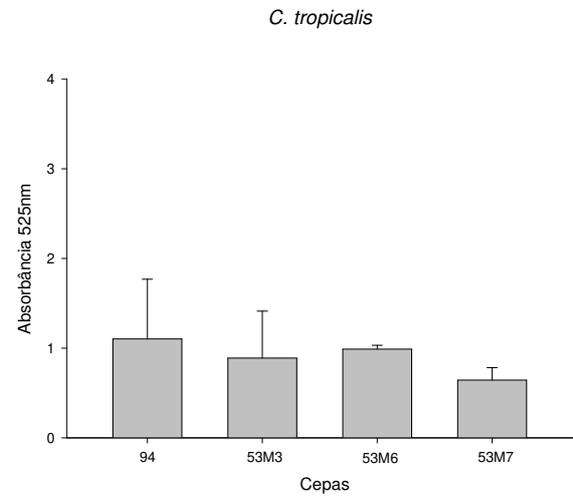
**Figura 2:** Padrão de desenvolvimento de biofilme da espécie *C. albicans*



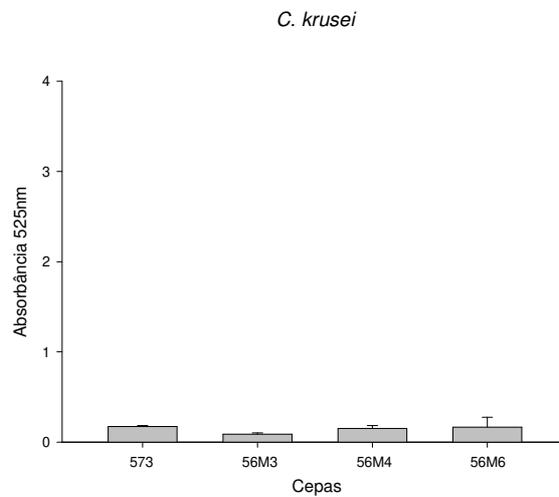
**Figura 3:** Padrão de desenvolvimento de biofilme da espécie *C. dubliniensis*



**Figura 4:** Padrão de desenvolvimento de biofilme da espécie *C. parapsilosis*



**Figura 5:** Padrão de desenvolvimento de biofilme da espécie *C. tropicalis*



**Figura 6:** Padrão de desenvolvimento de biofilme da espécie *C. krusei*

### **5.3 Atividade antimicrobiana do óleo essencial e da Fração<sub>8-10</sub> de *C. sativum* frente ao biofilme de isolados orais de *Candida* spp.**

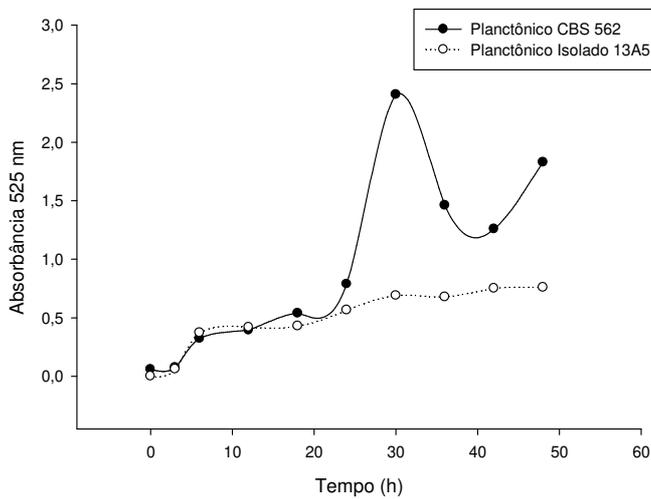
Como descrito no item 5.1, referente aos resultados apresentados nas Tabelas 7,8,9, os testes de atividade anti-*Candida* utilizando biofilmes foram feitos com o óleo essencial de *C. sativum*, cuja capacidade inibitória frente às células planctônicas foi superior aos óleos essenciais e extratos vegetais das demais espécies estudadas.

Durante o cultivo do biofilme das leveduras foram feitas aplicações do óleo essencial a intervalos regulares durante 24 h, em duas diferentes concentrações, sendo a primeira correspondente a MIC encontrada para a célula planctônica das leveduras, e 1 mg/mL. Tal procedimento foi feito com o objetivo de verificar se o óleo seria capaz de impedir ou desestabilizar a formação do biofilme. Os intervalos de tempo onde foram feitas as aplicações de óleo essencial foram: antes da adesão das células planctônicas (tzero), após a pré- adesão (t3 h) e após 6 h, 12 h, 18 h, 24 h e 42h.

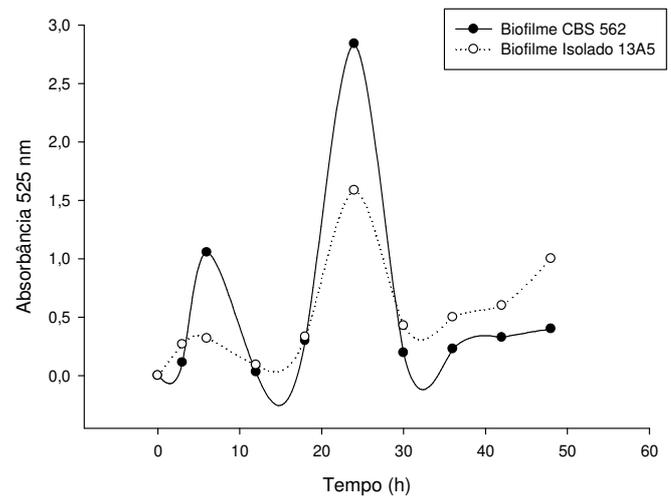
As curvas de desenvolvimento dos microrganismos, referentes ao cultivo com células planctônicas e biofilmes (ambos sem tratamento), bem como durante os tratamentos realizados com o óleo essencial e padrões utilizados como controles, estão ilustradas nas Figuras 7a a 11j.

Visando obter mais informações a respeito do desenvolvimento do biofilme, assim como a atuação do óleo essencial de *C. sativum*, os experimentos foram realizados até 48h, para avaliação da ação do óleo sobre o biofilme mais amadurecido.

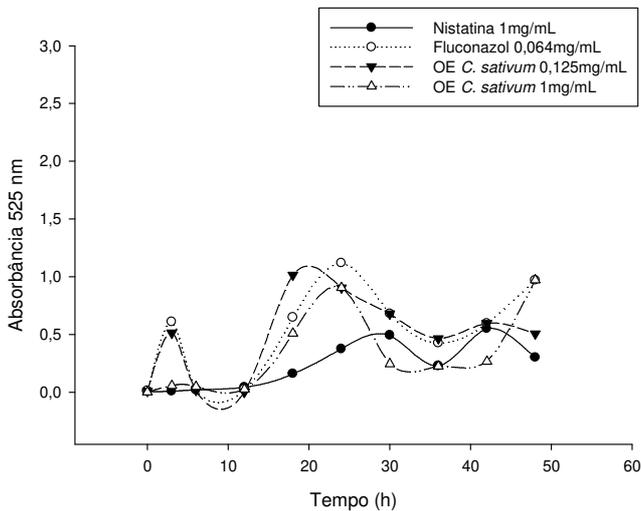
**5.3.1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* frente ao biofilme de *Candida albicans***



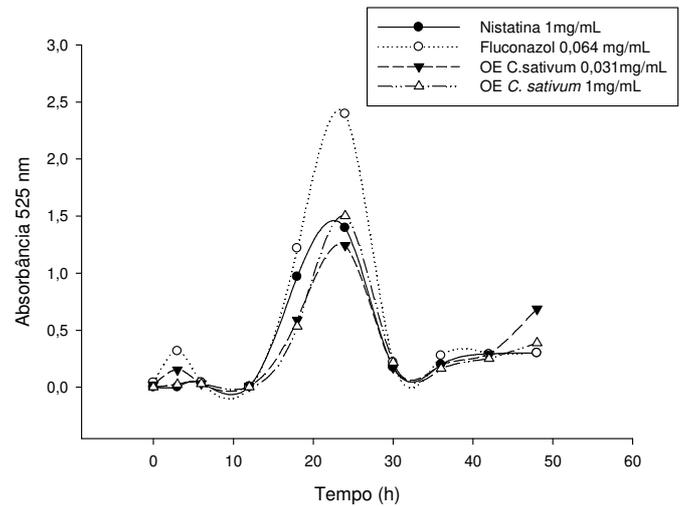
**Figura 7a:** Curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 e do isolado clínico 13A5.



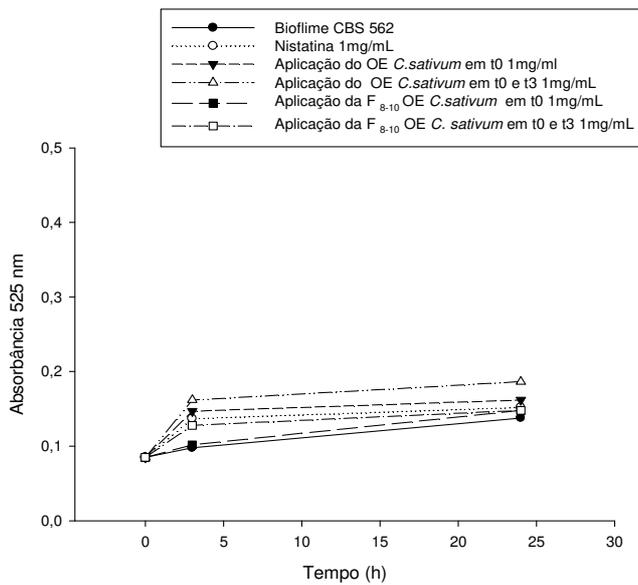
**Figura 7b:** Curva de crescimento do biofilme de *C. albicans* CBS 562 e do isolado clínico 13A5.



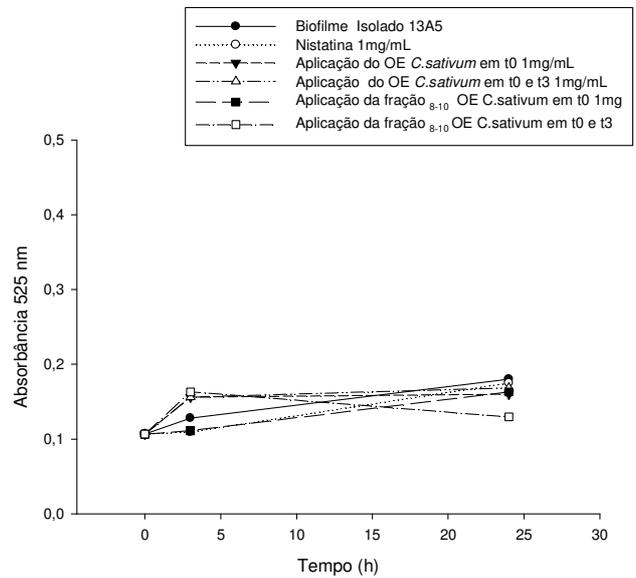
**Figura 7c:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. albicans* CBS 562 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.



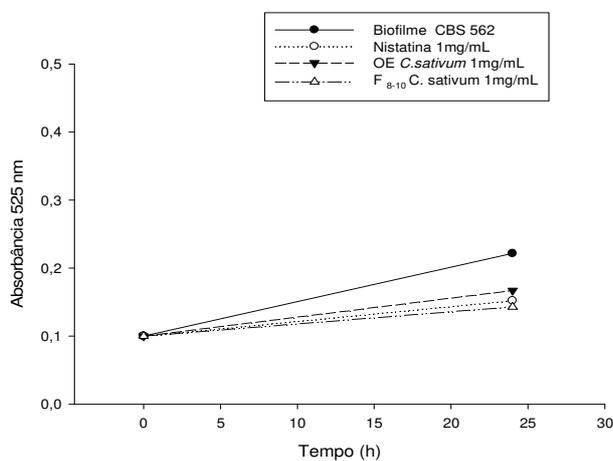
**Figura 7d:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. albicans* isolado clínico 13A5 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.



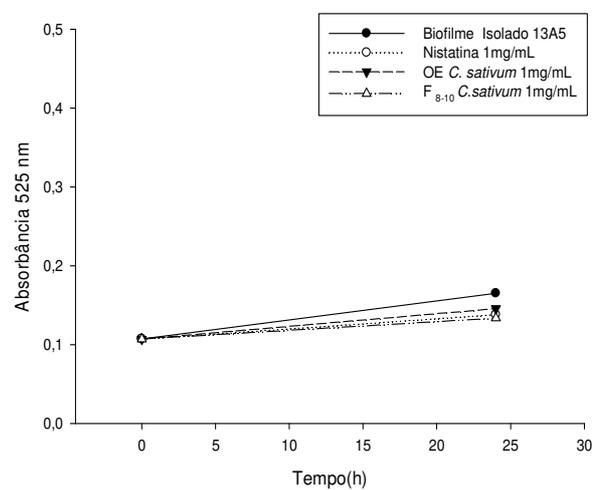
**Figura 7e:** Efeito da nistatina, do óleo essencial e frações F<sub>8-10</sub> combinadas de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. albicans* CBS 562.



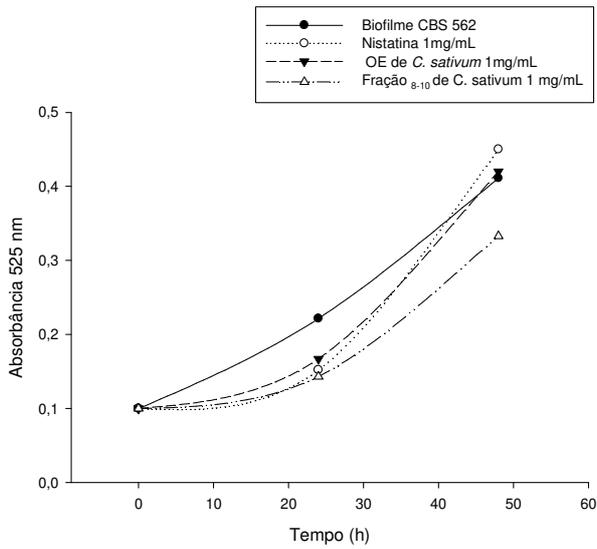
**Figura 7f:** Efeito da nistatina, do óleo essencial e frações F<sub>8-10</sub> combinadas de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. albicans* isolado clínico 13A5.



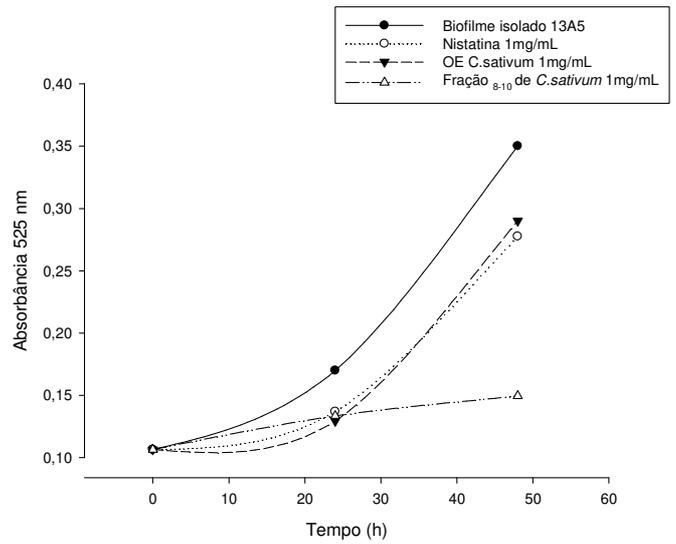
**Figura 7g:** Efeito da nistatina, do óleo essencial e frações F<sub>8-10</sub> combinadas de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. albicans* CBS 562, quando aplicados a cada 6h durante 24h.



**Figura 7h:** Efeito da nistatina, do óleo essencial e frações F<sub>8-10</sub> combinadas de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. albicans* isolado clínico 13A5, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

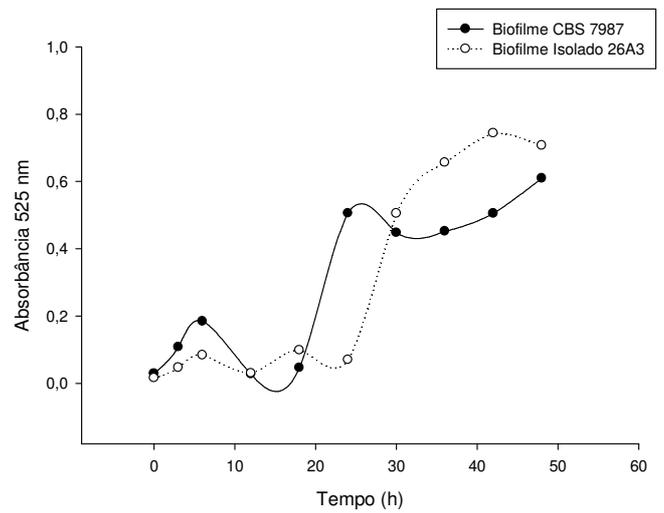
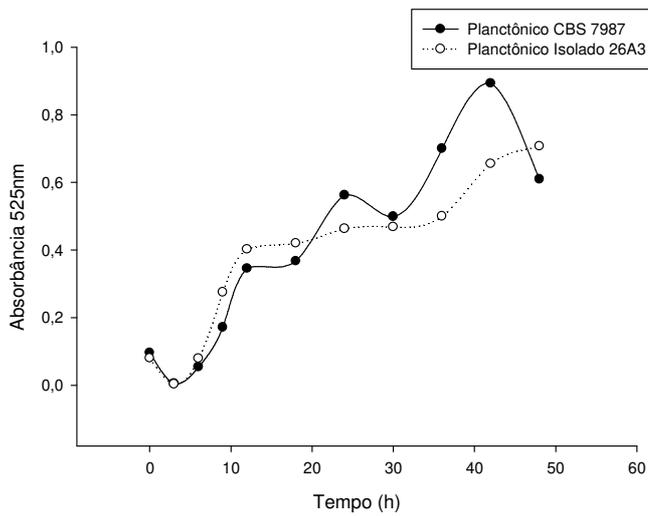


**Figura 7i:** Efeito da nistatina, do óleo essencial e frações F<sub>8-10</sub> combinadas de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. albicans* CBS 562.



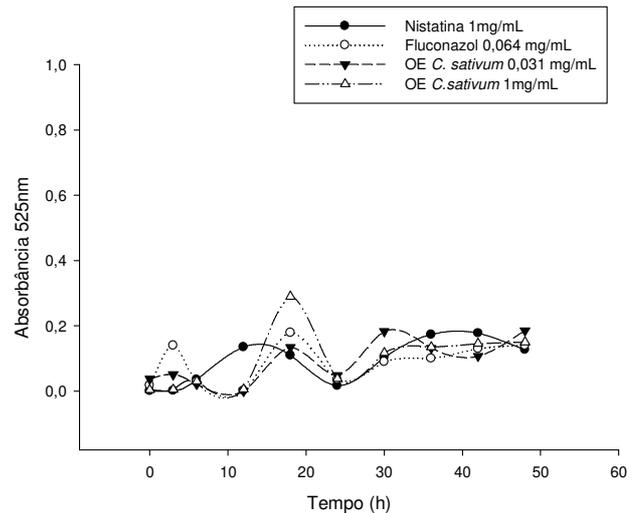
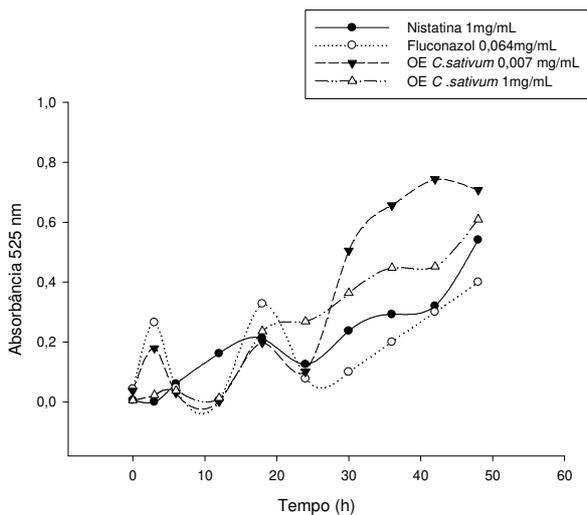
**Figura 7j:** Efeito da nistatina, do óleo essencial e frações F<sub>8-10</sub> combinadas de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. albicans* isolado clínico 13A5.

**5.3.2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* frente ao biofilme de *Candida dubliniensis***



**Figura 8a:** Curva de crescimento planctônico de *C. dubliniensis* CBS 7987 e do isolado clínico 26A3.

**Figura 8b:** Curva de crescimento do biofilme de *C. dubliniensis* CBS 7987 e do isolado clínico 26A3.



**Figura 8c:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. dubliniensis* CBS 7987 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.

**Figura 8d:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. dubliniensis* isolado clínico 26A3 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.

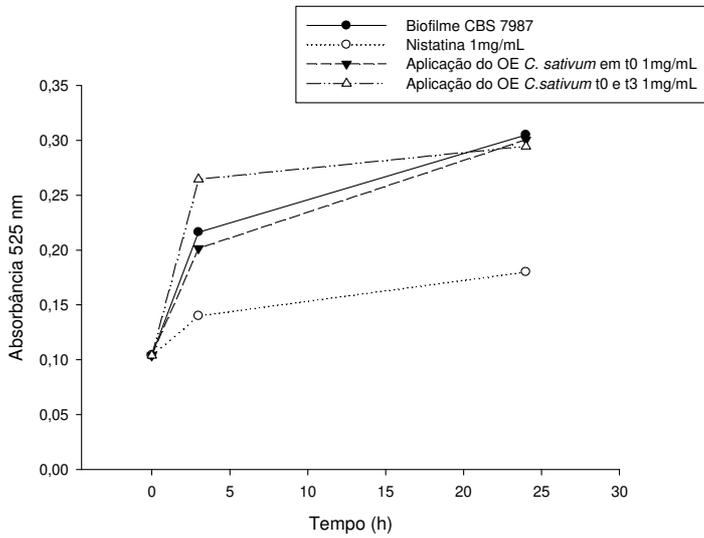


Figura 8e: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. dubliniensis* CBS 7987.

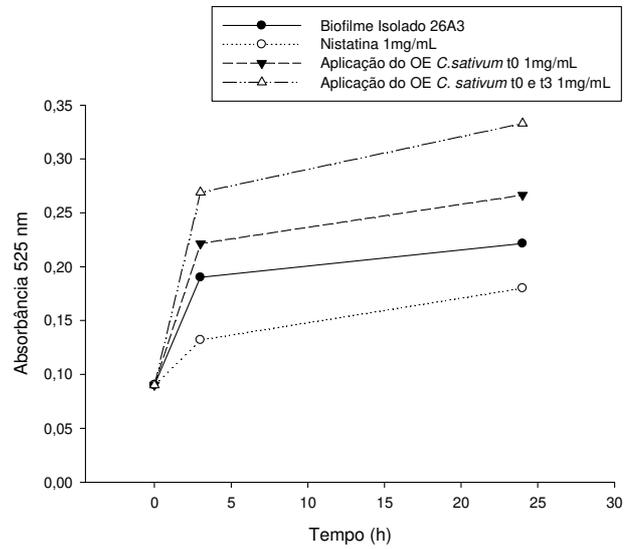


Figura 8f: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. dubliniensis* isolado clínico 26A3.

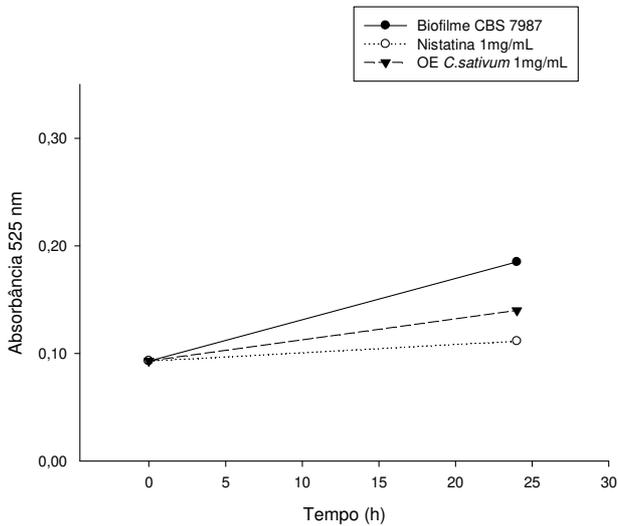


Figura 8g: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. dubliniensis* CBS 7987, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

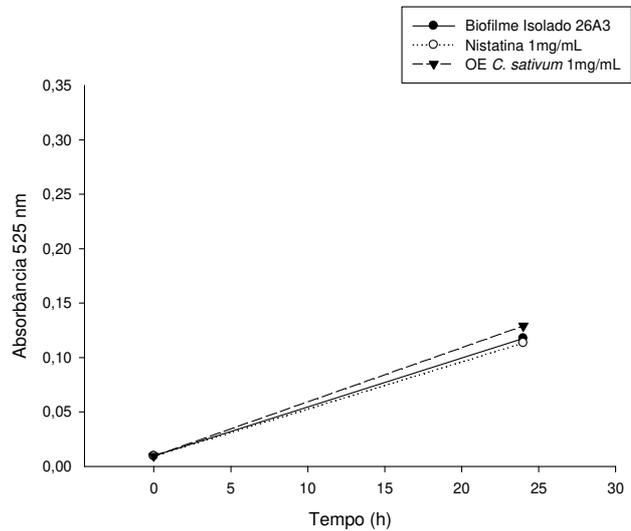
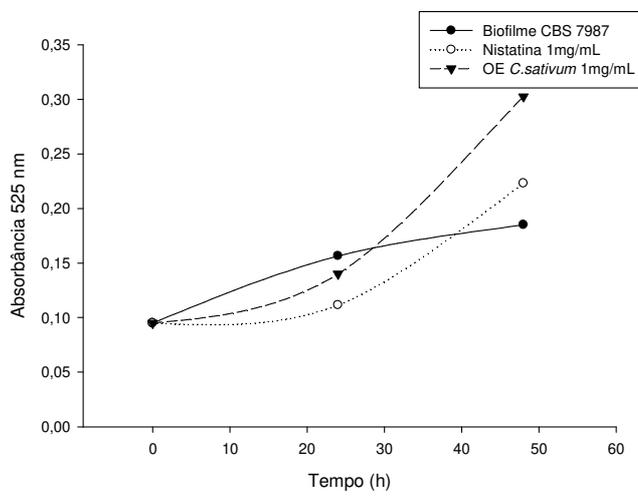
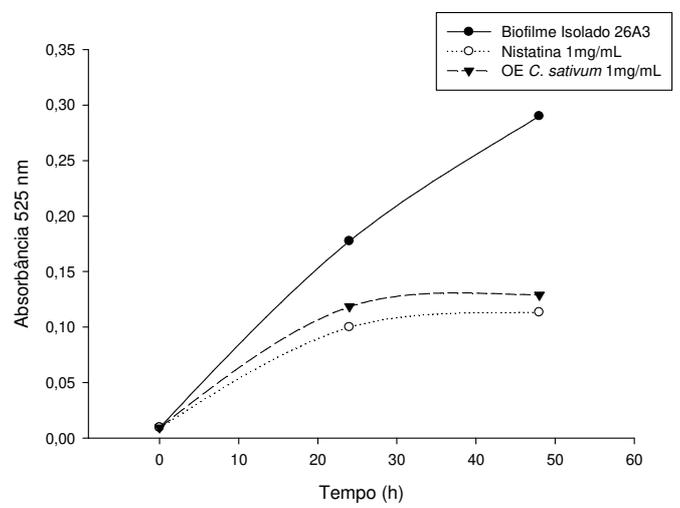


Figura 8h: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. dubliniensis* CBS 26A3, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

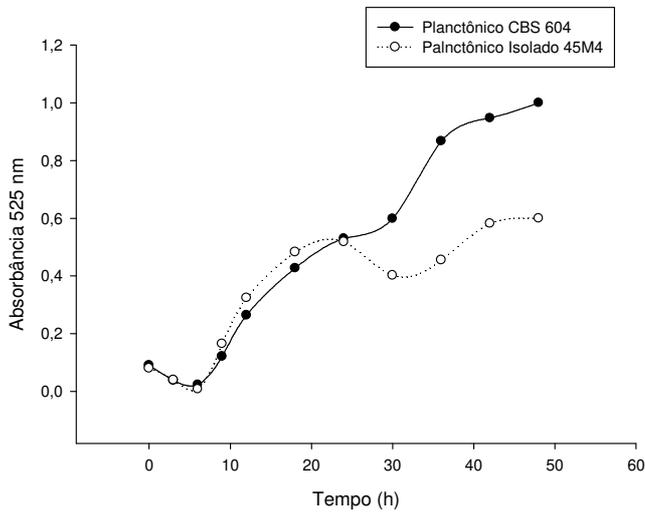


**Figura 8i:** Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. dubliniensis* CBS 7987.

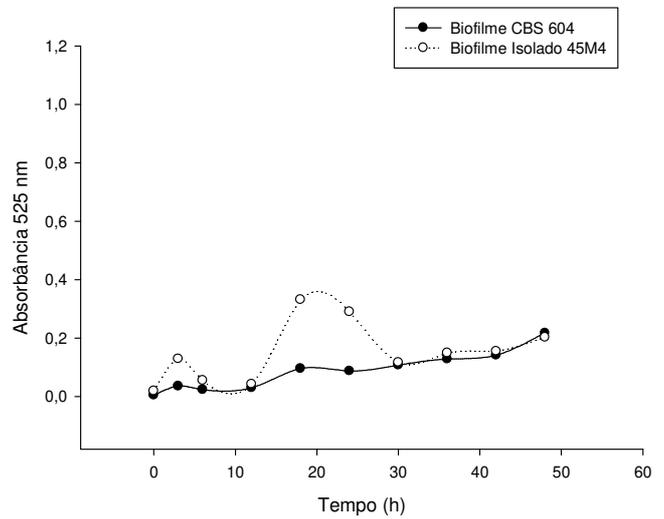


**Figura 8j:** Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. dubliniensis* isolado clínico 26A3.

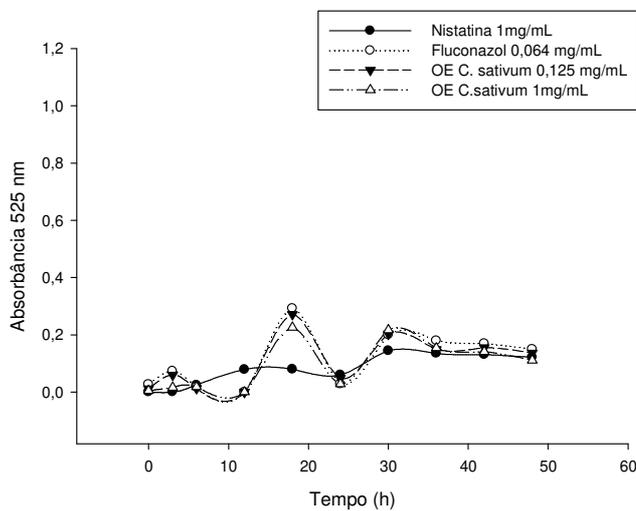
**5.3.3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* frente ao biofilme de *Candida parapsilosis***



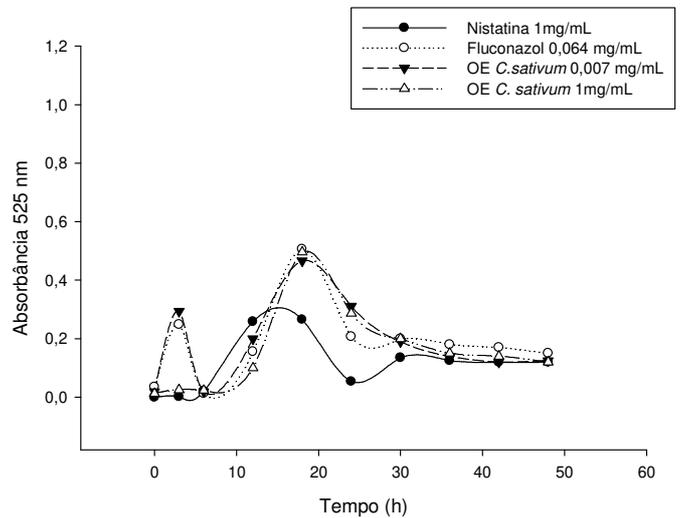
**Figura 9a:** Curva de crescimento planctônico de *C. parapsilosis* CBS 604 e do isolado clínico 45M4.



**Figura 9b:** Curva de crescimento do biofilme de *C. parapsilosis* CBS 604 e do isolado clínico 45M4.



**Figura 9c:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. parapsilosis* CBS 604 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.



**Figura 9d:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. parapsilosis* isolado clínico 45M4 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.

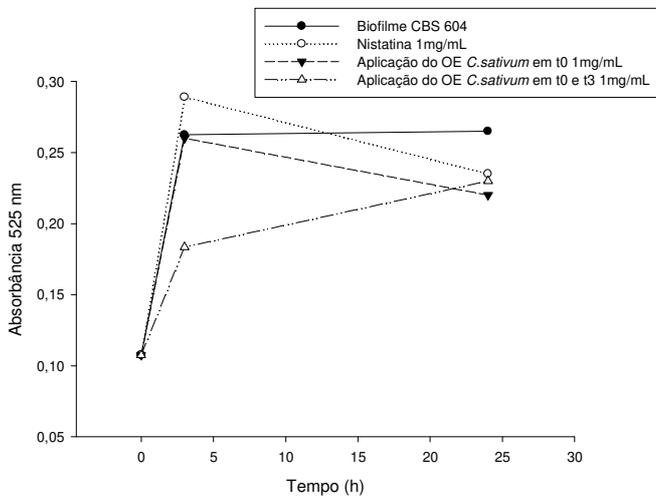


Figura 9e: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. parapsilosis* CBS 604.

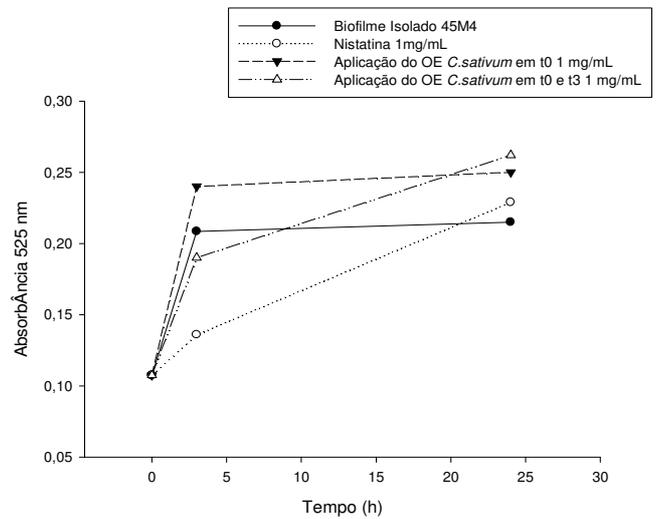


Figura 9f: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. parapsilosis* isolado clínico 45M4.

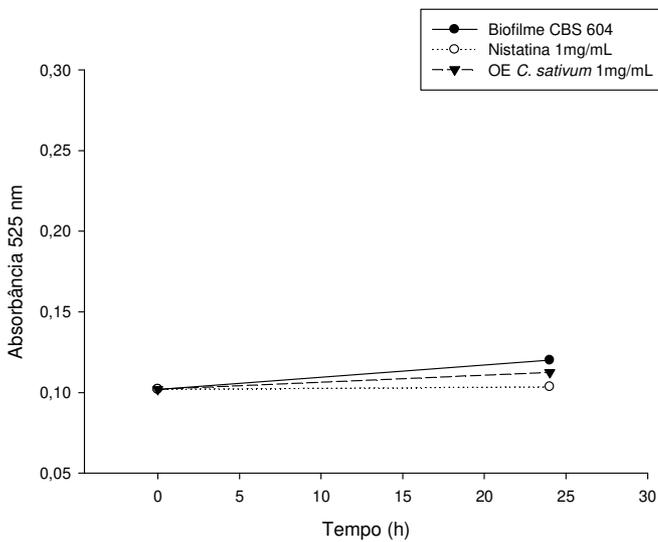


Figura 9g: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. parapsilosis* CBS 604, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

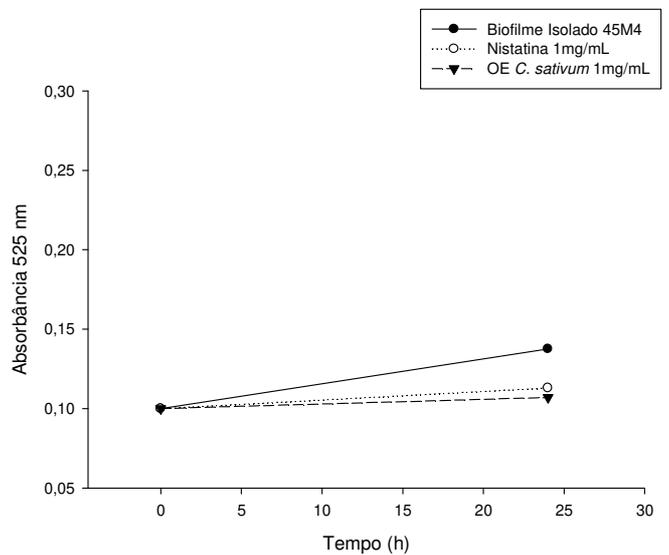
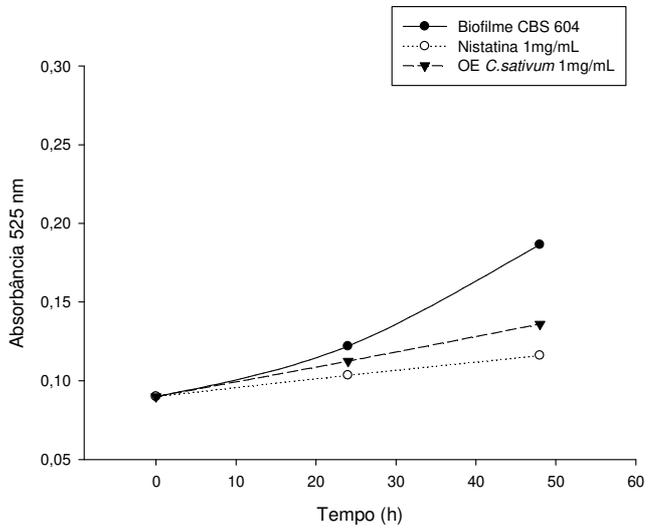
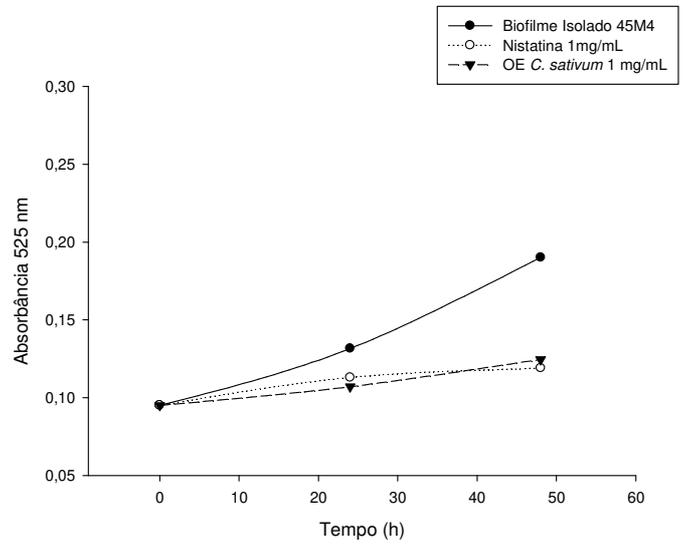


Figura 9h: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. parapsilosis* isolado clínico 45M4, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

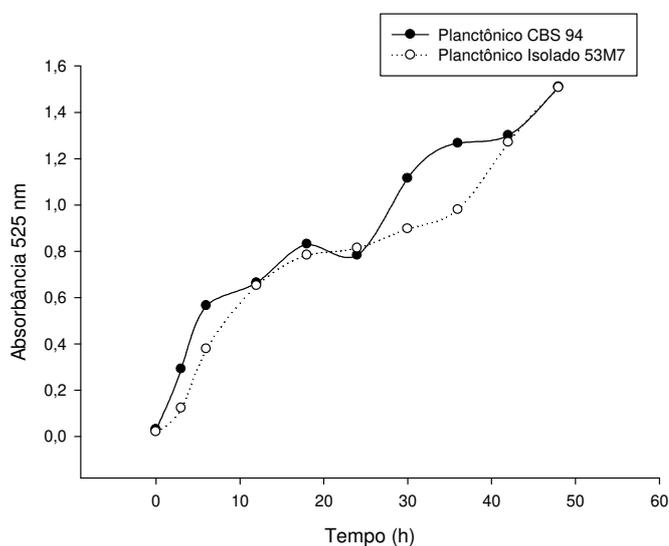


**Figura 9i:** Efeito da nistatina e do óleo essencial *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. parapsilosis* CBS 604.

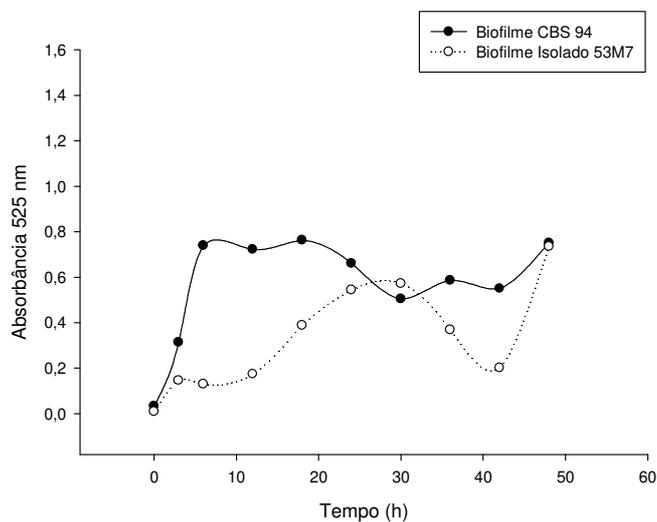


**Figura 9j:** Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. parapsilosis* isolado 45M4.

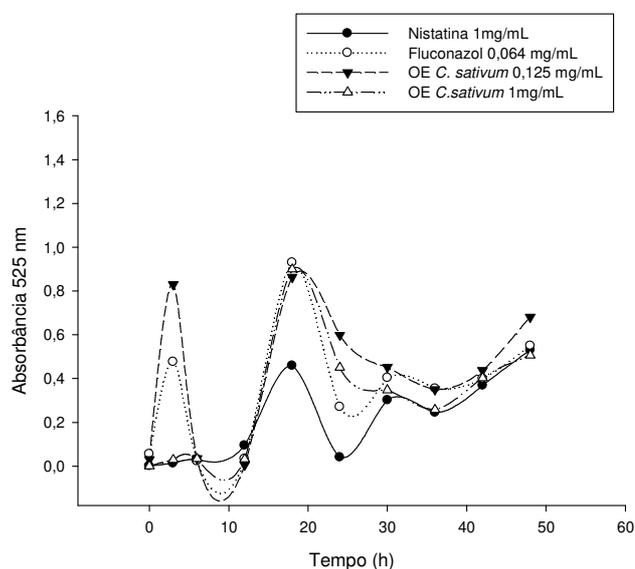
### 5.3.4. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* frente ao biofilme de *Candida tropicalis*



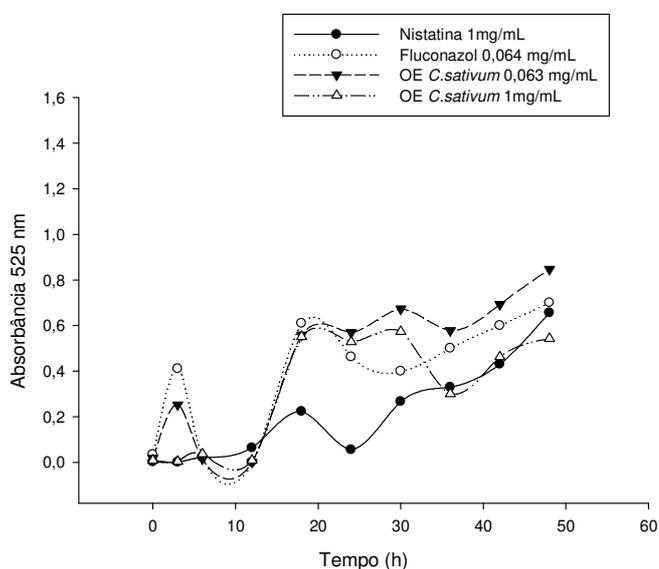
**Figura 10a:** Curva de crescimento planctônico de *C. tropicalis* CBS 94 e do isolado clínico 53M7.



**Figura 10b:** Curva de crescimento do biofilme de *C. tropicalis* CBS 94 e do isolado clínico 53M7.



**Figura 10c:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. tropicalis* CBS 94 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.



**Figura 10d:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. tropicalis* isolado clínico 53M7 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.

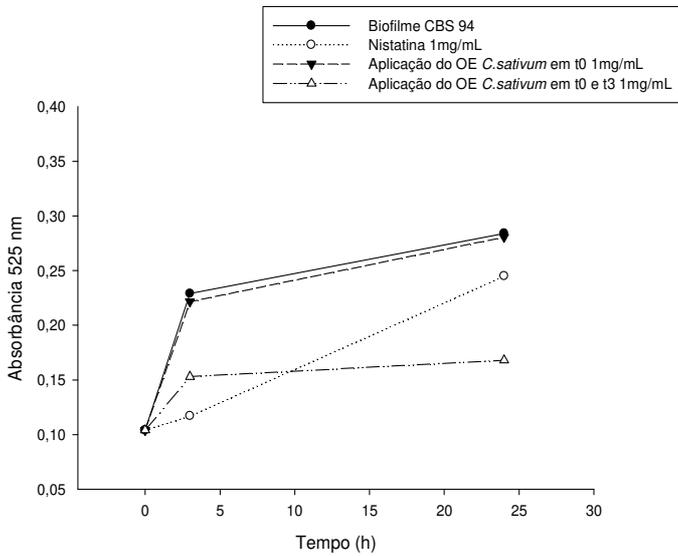


Figura 10e: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. tropicalis* CBS 94.

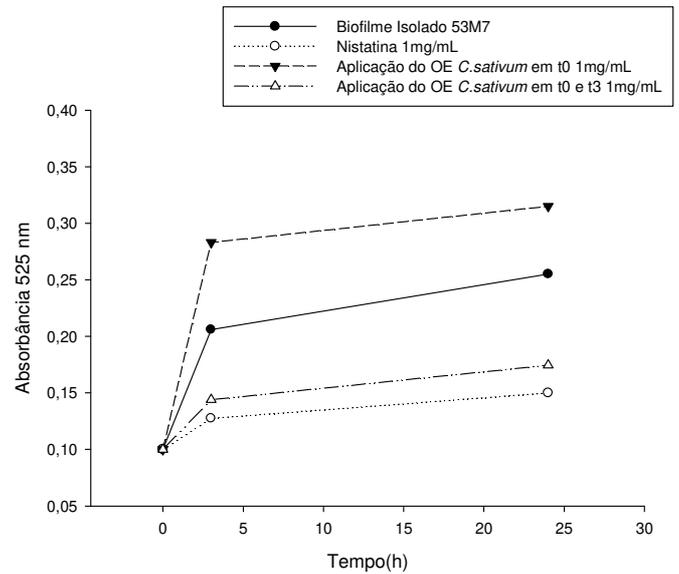


Figura 10f: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. tropicalis* isolado clínico 53M7.

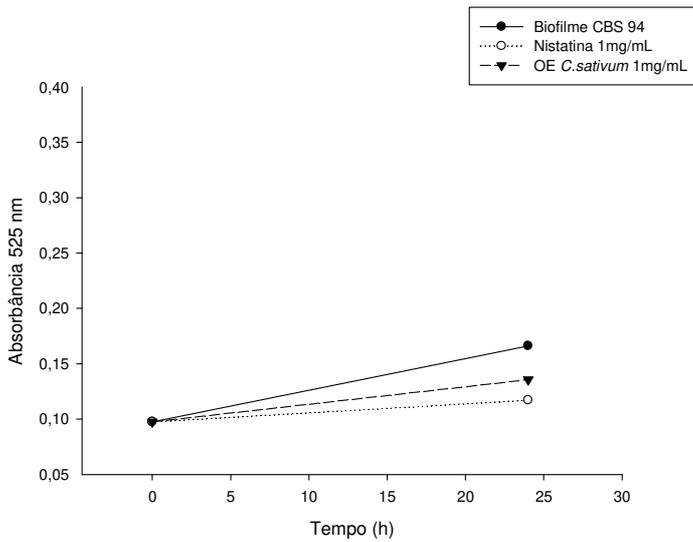


Figura 10g: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. tropicalis* CBS 94, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

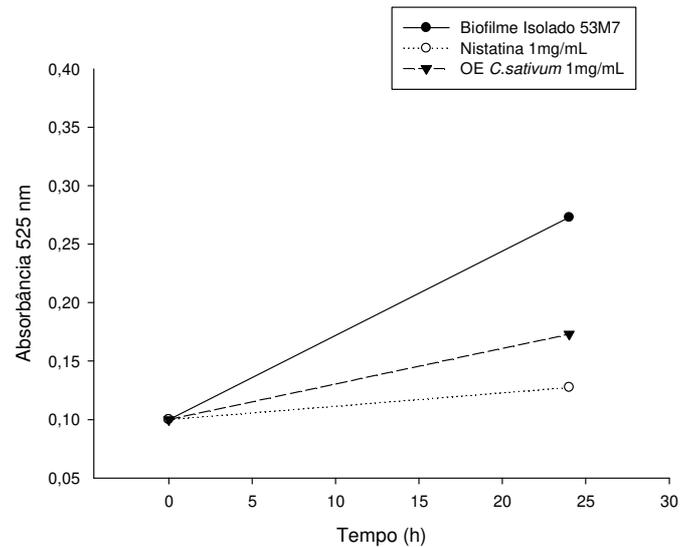
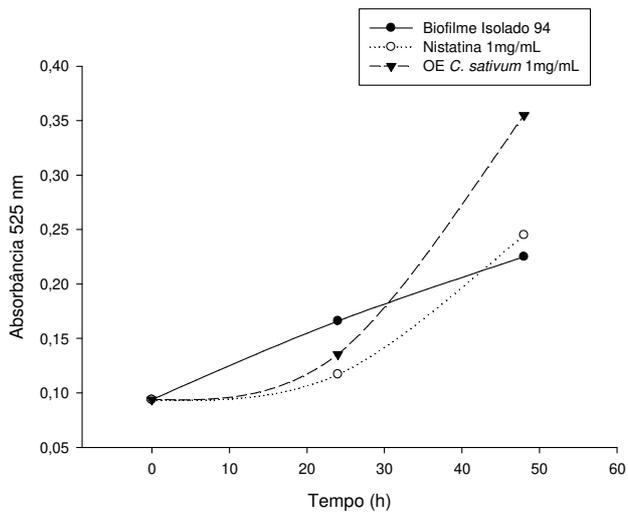
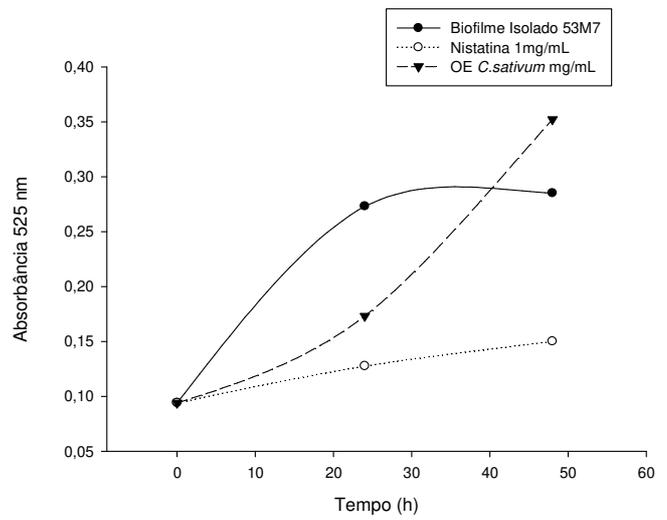


Figura 10h: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. tropicalis* isolado clínico 53M7, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

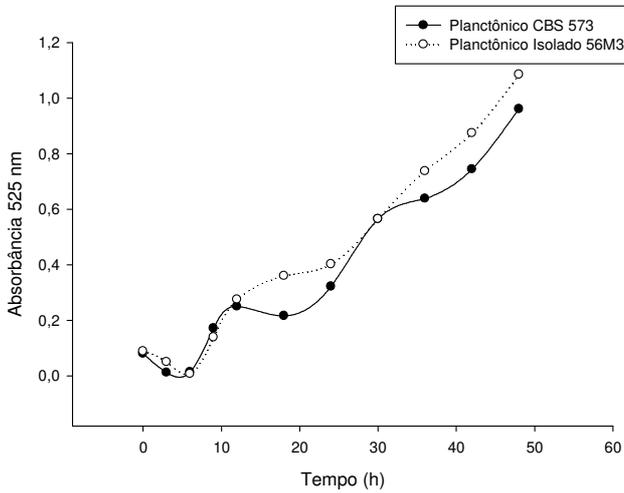


**Figura 10i:** Efeito da nistatina e do óleo essencial *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. tropicalis* CBS 94.

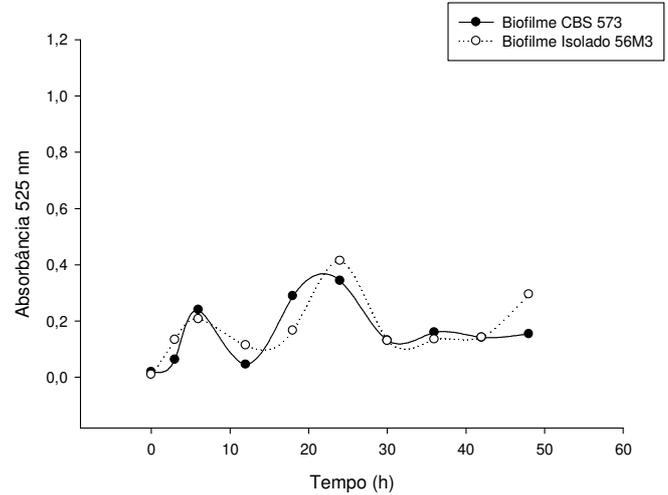


**Figura 10j:** Efeito da nistatina e do óleo essencial *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. tropicalis* isolado clínico 53M7.

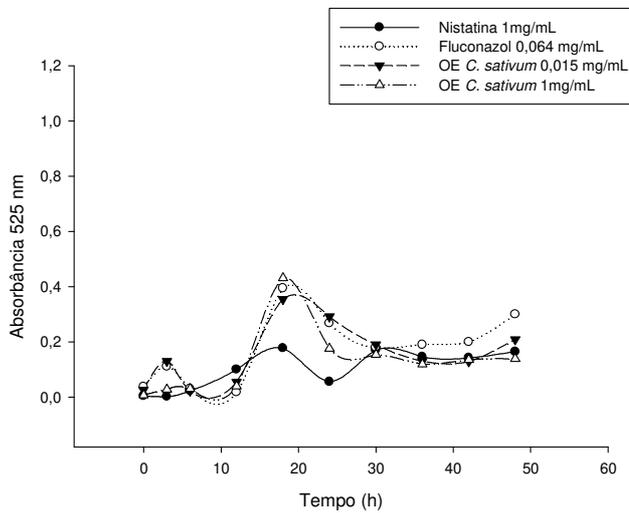
**5.3.5. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* frente ao biofilme de *Candida krusei***



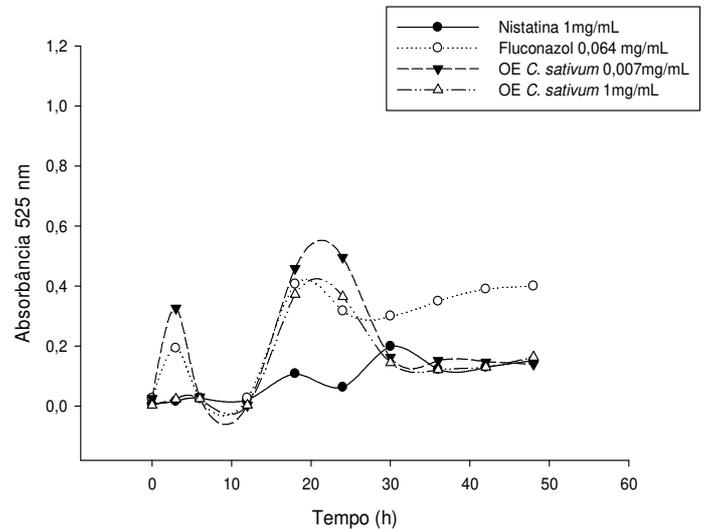
**Figura 11a:** Curva de crescimento planctônico de *C. krusei* CBS 573 e do isolado clínico 56M3.



**Figura 11b:** Curva de crescimento do biofilme *C.krusei* CBS 573 e do isolado clínico 53M6.



**Figura 11c:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. krusei* CBS 573 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*.



**Figura 11d:** Cinética de crescimento do biofilme de *C. krusei* isolado clínico 56M3 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum*..

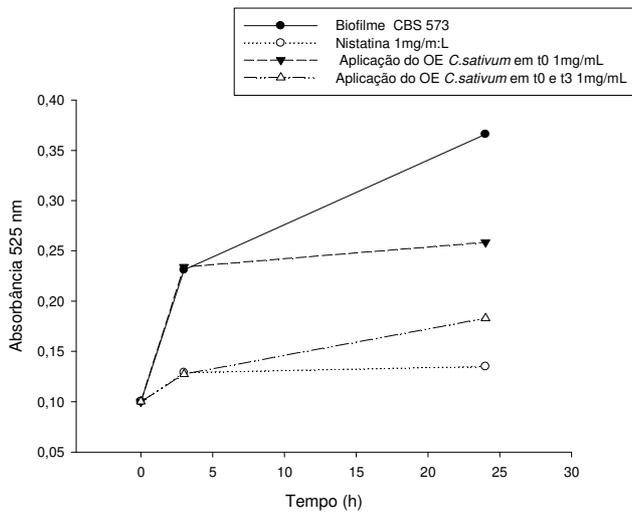


Figura 11e: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. krusei* CBS 573.

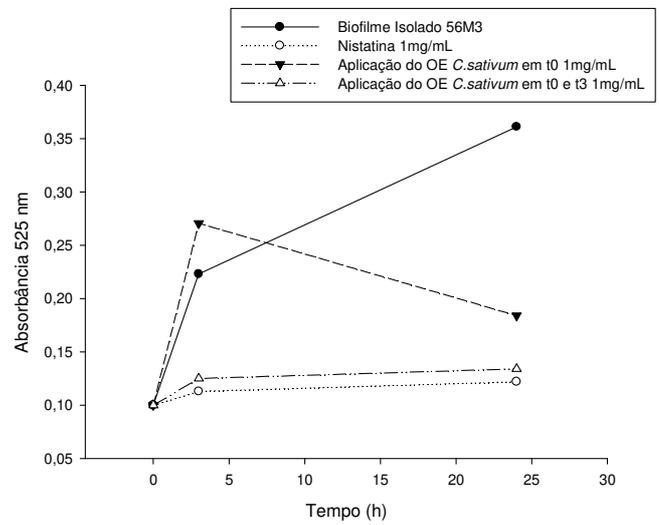


Figura 11f: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. krusei* isolado clínico 56M3.

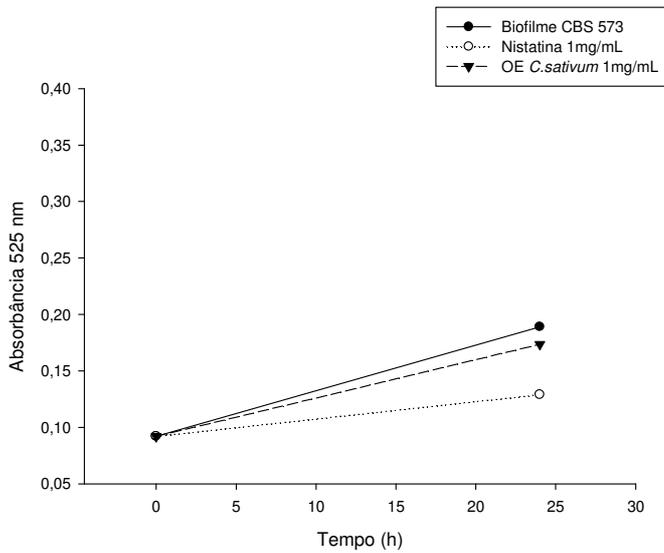


Figura 11g: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. krusei* CBS 573, quando aplicados a cada 6h durante 24h.

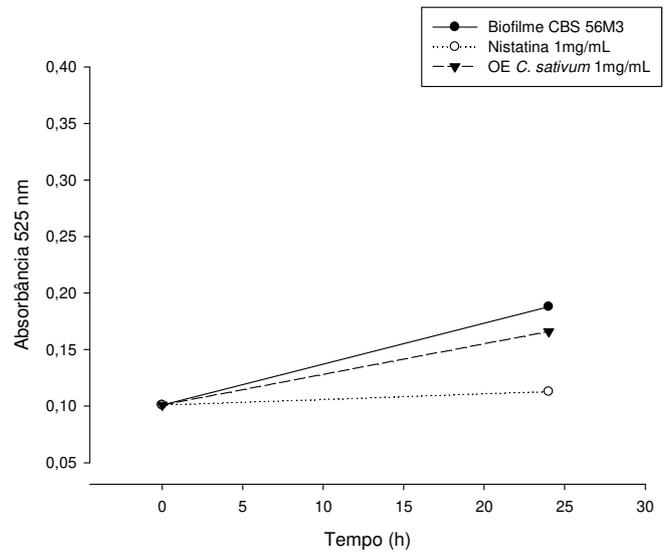
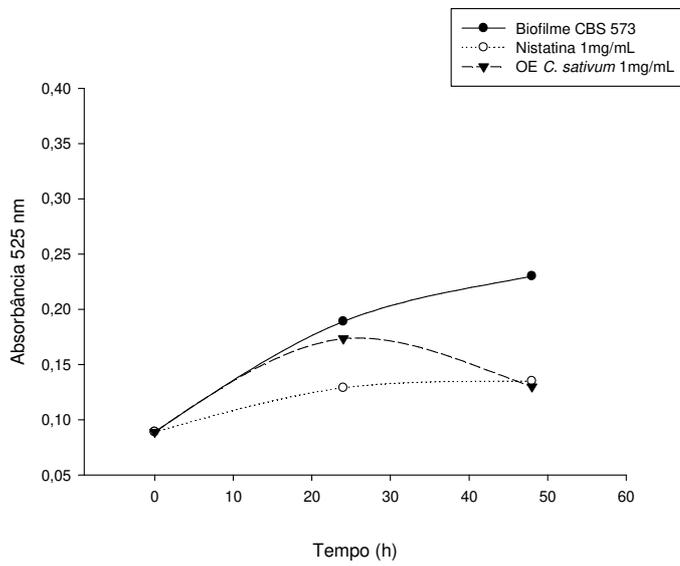
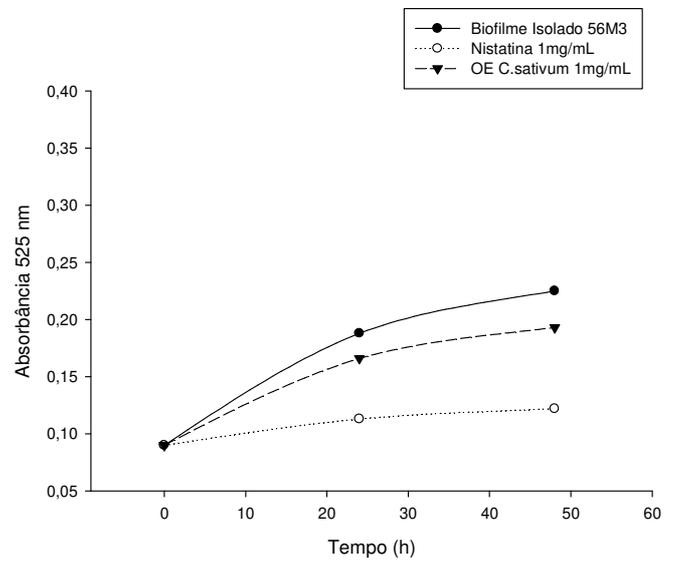


Figura 11h: Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. krusei* isolado clínico 56M3, quando aplicados a cada 6h durante 24h.



**Figura 11i:** Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. krusei* CBS 573.



**Figura 11j:** Efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme amadurecido (48h) de *C. krusei* isolado 56M3.

#### 5.4. Composição química do óleo essencial de *C. sativum*.

A composição química do óleo essencial de *C. sativum* está apresentada nas Figuras 12 a 17 e Tabelas 11 a 16.

A avaliação foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os constituintes mais relevantes foram identificados por comparação dos espectros de massas com os da biblioteca eletrônica NIST, bem como por comparação dos dados de Índice de Retenção e espectros de massas descritos na literatura (Adams, 1995; Pino, 2001), coletados em condições cromatográficas similares.

Na Tabela 17 estão apresentados os dados referentes à atividade anti-*Candida* do óleo essencial bruto, fração 8-10 e compostos bioativos de *C. sativum*.

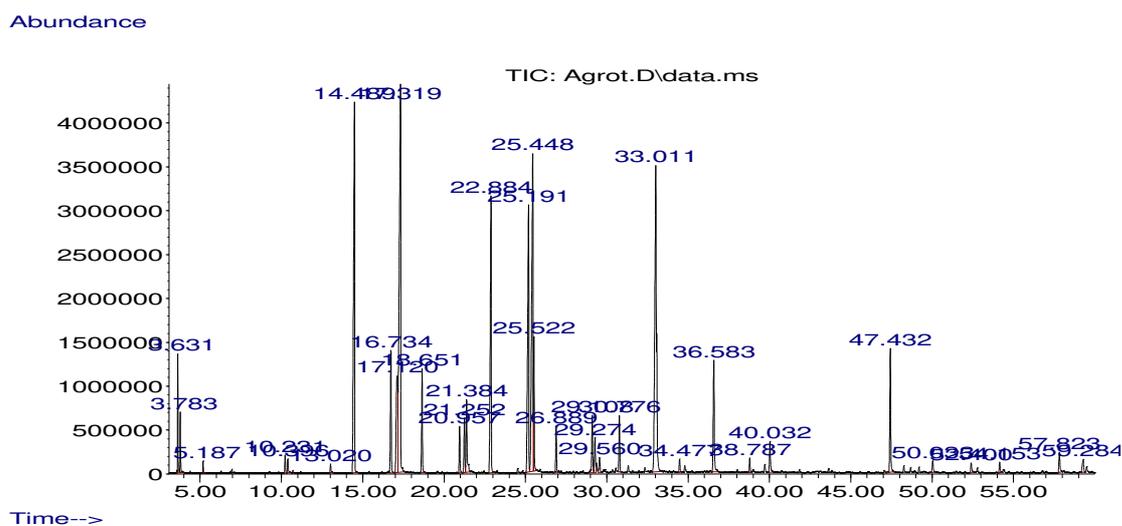
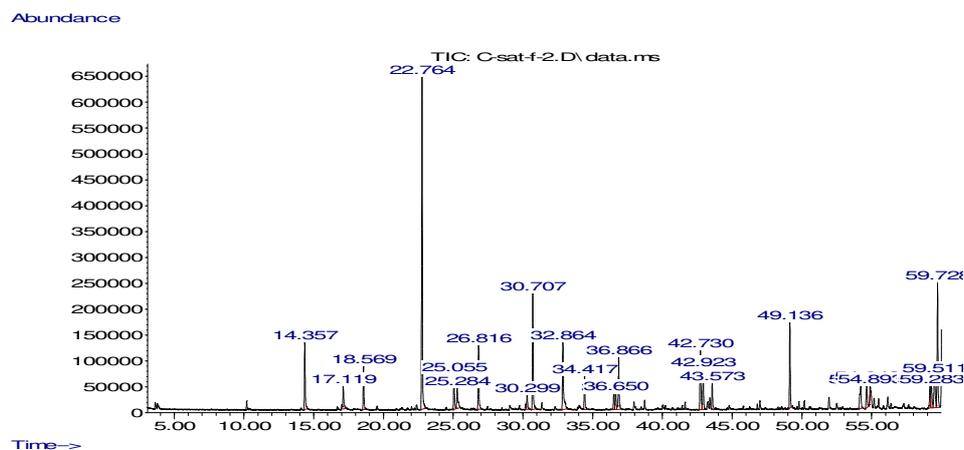


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial (bruto) de *C. sativum*.

**Tabela 11.** Compostos identificados, tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) do óleo essencial de *C. sativum*.

$t_R$ (min.)	IR	Identificação	% rel.
3,63	---	3-hexen-1-ol <Z>	1,24
3,78	---	2-hexen-1-ol <Z>	0,77
5,19	933	alfa-pineno	0,15
10,23	1101	n.i.	0,33
10,40	1106	nonanal	0,28
13,02	1172	n.i.	0,19
14,49	1209	decanal	10,97
16,73	1262	9-decen-1-ol	2,74
17,12	1272	2-decen-1-ol <E>	4,11
17,32	1277	n.i.	15,30
18,65	1309	undecanal	2,20
20,96	1364	n.i.	1,01
21,25	1371	n.i.	1,21
21,38	1375	n.i.	1,96
22,89	1411	dodecanal	7,53
25,19	1469	2-dodecenal	8,16
25,45	1475	2-dodecenol	11,26
25,52	1477	n.i.	2,54
26,89	1512	tridecanal	1,00
29,11	1570	n.i.	1,44
29,28	1574	n.i.	0,86
29,56	1581	Óxido de cariofileno	0,47
30,78	1614	tetradecanal	1,26
33,01	1674	2-tetradecen-1-ol <E>	13,58
34,48	1715	n.i.	0,30
36,58	1775	n.i.	3,10
38,79	1841	n.i.	0,32
40,03	1879	n.i.	0,80
47,43	---	fitol	3,06
50,04	---	n.i.	0,36
52,40	---	n.i.	0,26
54,15	---	n.i.	0,26
57,83	---	n.i.	0,56
59,28	---	n.i.	0,46

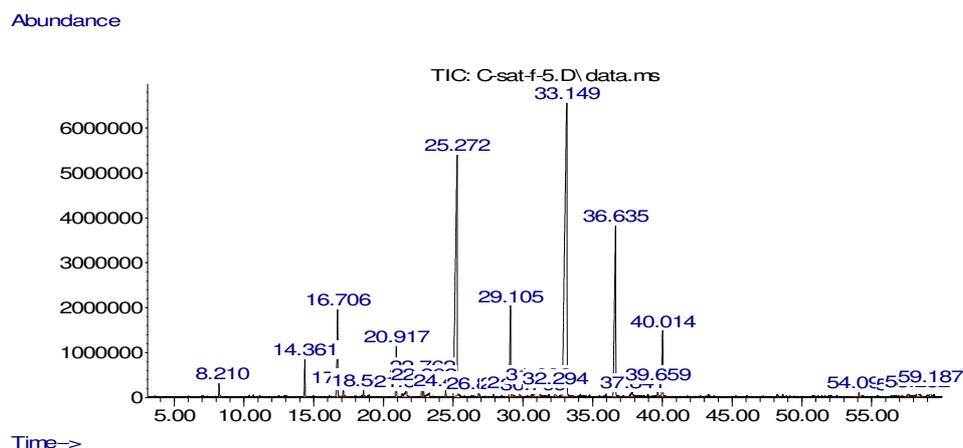
ni = não identificado



**Figura 13:** Cromatograma do óleo essencial de *C. sativum* (fração 3 e 4- F<sub>3,4</sub>).

**Tabela 12:** Compostos identificados, tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) na Fração 3,4 (F<sub>3,4</sub>) do óleo essencial de *C. sativum*. (ni= não identificado).

$t_R$ (min)	IR	Identificação	% rel.
14,36	1205	decanal	4,42
17,12	1272	decanol	1,84
18,57	1307	undecanal	2,81
22,77	1408	dodecanal	21,56
25,06	1466	2-dodecenal	2,64
25,28	1471	2-dodecenol	1,99
26,82	1510	tridecanal	4,46
30,30	1601	n.i.	1,11
30,71	1612	tetradecanal	7,95
32,86	1670	n.i.	5,76
34,42	1713	n.i.	2,41
36,51	1774	n.i.	1,24
36,65	1777	n.i.	1,27
36,87	1784	n.i.	3,98
42,73	1962	n.i.	5,16
42,92	1968	n.i.	3,05
43,58	1988	n.i.	1,92
49,13	---	éster decílico do ácido decanóico	5,59
54,22	---	n.i.	2,63
54,64	---	n.i.	2,09
54,89	---	n.i.	0,23
59,18	---	n.i.	1,76
59,28	---	n.i.	2,15
59,51	---	n.i.	3,47
59,73	---	n.i.	8,52

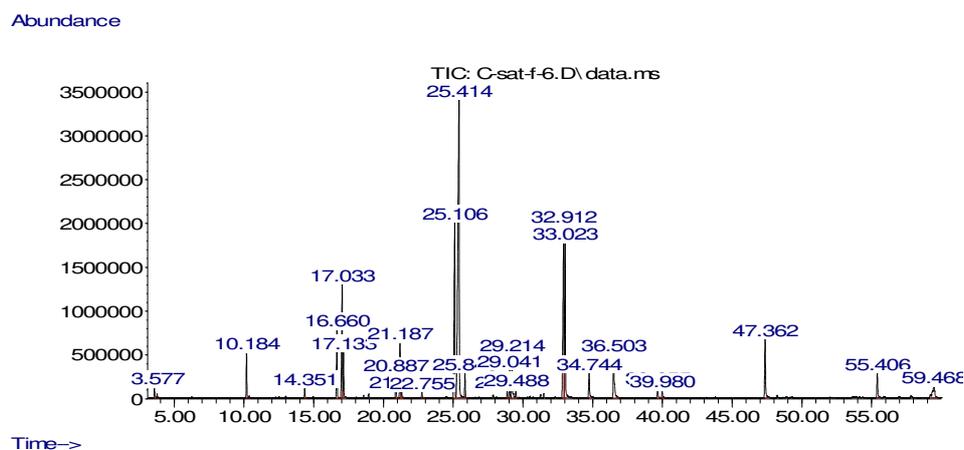


**Figura 14:** Cromatograma do óleo essencial de *C. sativum* (fração 5 - F<sub>5</sub>).

**Tabela 13:** Compostos identificados, tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) na Fração 5 (F<sub>5</sub>) do óleo essencial de *C. sativum*.

$t_R$ (min)	IR	Identificação	% rel.
8,21	1041	benzoacetaldéido	0,51
14,36	1206	decanal	1,38
16,71	1262	9-decen-1-ol	4,07
17,12	1272	2-decen-1-ol <E>	0,46
18,57	1307	undecanal	0,29
20,92	1363	n.i.	2,09
21,62	1380	ácido decanóico	0,93
22,76	1408	dodecanal	0,83
22,86	1411	n.i.	0,51
24,46	1451	n.i.	0,33
25,15	1468	2-dodecenal	24,01
26,83	1510	tridecanal	0,27
29,10	1569	n.i.	4,64
29,25	1573	ácido dodecanóico	0,03
29,75	1586	n.i.	0,25
30,71	1612	n.i.	0,32
31,08	1622	n.i.	1,88
32,30	1655	n.i.	0,45
33,15	1678	tetradecenal	38,26
36,63	1777	n.i.	11,76
37,84	1812	n.i.	0,63
39,66	1868	n.i.	0,54
40,02	1879	n.i.	3,09
54,09	---	n.i.	0,23
57,60	---	n.i.	0,35
58,25	---	n.i.	0,94
59,19	---	n.i.	0,67

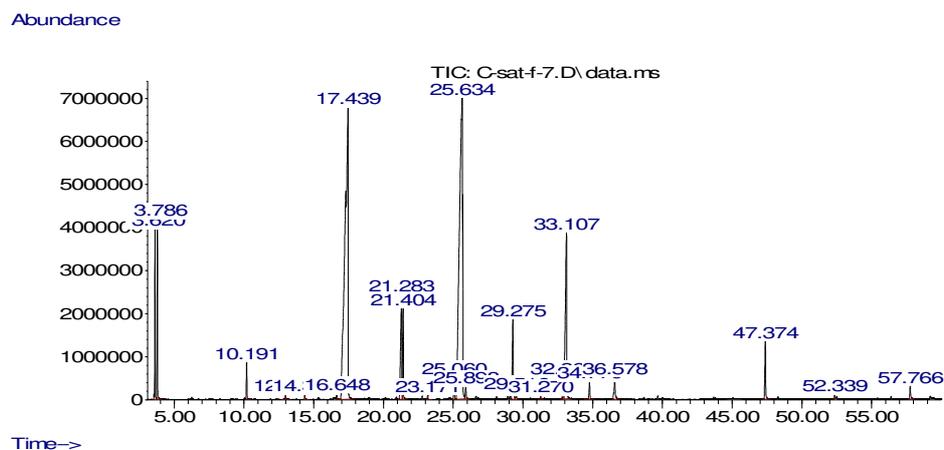
ni= não identificado



**Figura 15:** Cromatograma do óleo essencial de *C. sativum* (fração 6 – F<sub>6</sub>)

**Tabela 14:** Compostos identificados, tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) na Fração 6 (F<sub>6</sub>) do óleo essencial de *C. sativum*. (ni= não identificado).

$t_R$ (min)	IR	Identificação	% rel.
3,58	---	3-hexen-1-ol <E>	0,46
10,19	1100	n.i.	1,87
14,35	1205	decanal	0,48
16,66	1261	2-decenal <E>	3,36
17,04	1270	2-decen-1-ol	6,29
17,13	1272	2-decen-1-ol <E>	2,13
20,89	1363	n.i.	1,18
21,19	1370	n.i.	2,83
21,30	1373	n.i.	0,42
22,76	1408	dodecanal	0,38
25,11	1467	2-dodecenal	11,08
25,41	1474	2-dodecenol	30,05
25,85	1485	beta-ionona <E>	1,25
28,87	1563	nerolidol <E>	0,36
29,04	1568	n.i.	1,49
29,22	1572	2-tridecen-1-ol <E>	2,60
29,49	1579	óxido de cariofileno	0,57
32,91	1672	n.i.	10,97
33,02	1675	2-tetradecen-1-ol <E>	9,32
34,74	1723	n.i.	1,56
36,50	1773	n.i.	3,33
39,65	1868	n.i.	0,69
39,98	1878	n.i.	0,48
47,36	---	fitol	3,54
55,41	---	n.i.	1,53
59,47	---	n.i.	1,84

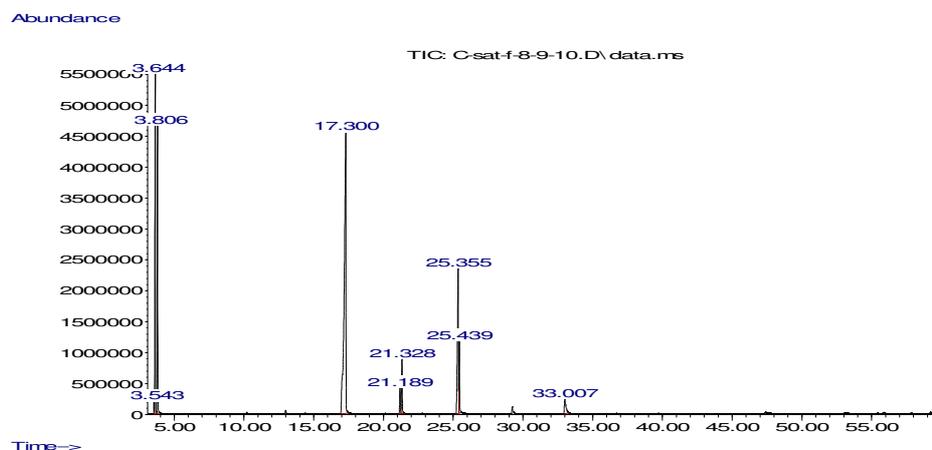


**Figura 16:** Cromatograma do óleo essencial de *C. sativum* (fração 7 – F<sub>7</sub>)

**Tabela 15:** Compostos identificados, tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) na Fração 7 (F<sub>7</sub>) do óleo essencial de *C. sativum*.

$t_R$ (min)	IR	Identificação	% rel.
3,62	---	3-hexen-1-ol <Z>	2,57
3,78	---	2-hexen-1-ol <Z>	3,19
10,19	1100	n.i.	0,83
12,97	1171	cis-pinocanfona	0,19
14,36	1205	decanal	0,13
16,65	1260	2-decenal <E>	0,18
17,44	1280	n.i.	33,25
21,28	1372	n.i.	4,40
21,41	1375	n.i.	2,62
23,17	1418	alfa-santaleno	0,12
25,06	1466	n.i.	0,60
25,64	1480	n.i.	35,59
25,90	1487	beta-ionona <E>	0,42
29,28	1574	n.i.	2,67
29,52	1580	óxido de cariofileno	0,23
31,27	1627	n.i.	0,12
32,87	1671	n.i.	0,62
33,11	1677	n.i.	8,44
34,77	1724	n.i.	0,58
36,58	1775	n.i.	0,91
47,37	2104	fitol	1,77
52,34	---	5-eicoseno <E>	0,11
57,77	---	n.i.	0,45

ni= não identificado



**Figura 17:** Cromatograma do óleo essencial de *C. sativum* (fração 8-10 – F<sub>8-10</sub>)

**Tabela 16:** Compostos identificados, tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção (IR) e porcentagem relativa (%) na Fração 8-10 (F<sub>8-10</sub>) do óleo essencial de *C. sativum*.

$t_R$ (min)	IR	Identificação	% rel.
<b>3,54</b>	---	<b>3-hexen-1-ol &lt;E&gt;</b>	<b>0,44</b>
<b>3,64</b>	---	<b>3-hexen-1-ol &lt;Z&gt;</b>	<b>16,08</b>
<b>3,81</b>	---	<b>2-hexen-1-ol &lt;Z&gt;</b>	<b>14,52</b>
<b>17,18</b>	<b>1273</b>	<b>ciclodecano</b>	<b>44,16</b>
21,19	1370	trans-2-decen-1-ol	1,71
21,33	1373	metil-ciclodecano	3,62
25,35	1473	n.i.	13,04
25,44	1475	1-deceno	4,43
33,01	1674	2-tetradecen-1-ol <E>	2,01

ni= não identificado

**Tabela 17:** Atividade anti-*Candida* (MIC - mg/mL) do óleo essencial(OE), fração 8-10 e compostos bioativos de *C. sativum*

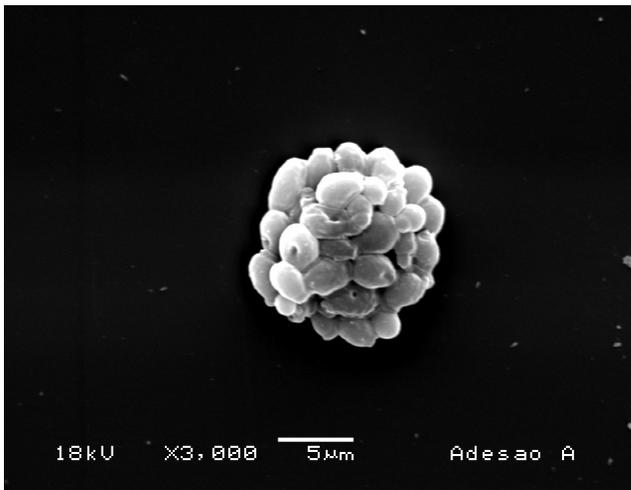
<b>Espécie de <i>Candida</i></b>	<b>Óleo bruto</b>	<b>Fração 8-10</b>	<b>2 hexenol cis</b>	<b>2 hexenol trans</b>	<b>3 hexenol cis</b>	<b>3 hexenol trans</b>	<b>Ciclohexano</b>	<b>Mistura</b>
<b><i>C. albicans</i> CBS 562</b>	0,015	0,015	0,063	0,031	0,500	0,063	0,031	0,0005
<b><i>C. albicans</i> 13 A5</b>	0,031	0,063	0,063	0,007	0,125	0,031	0,015	0,0005

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo: (A) - bolsa periodontal.

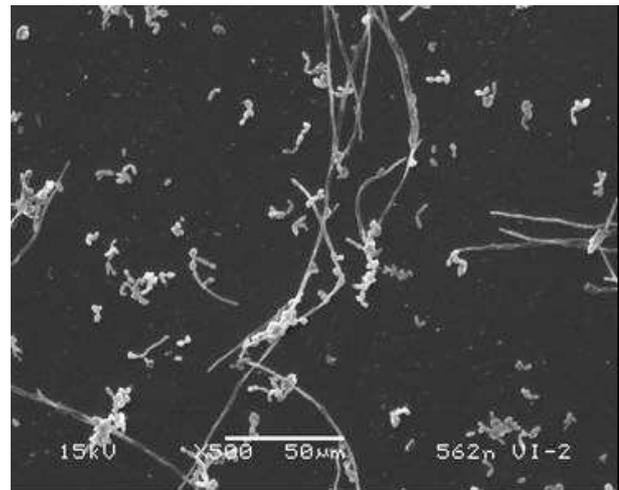
### 5.5 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens feitas por MEV mostrando o desenvolvimento dos biofilmes estudados, bem como aqueles relacionados aos tratamentos controle e utilizando óleo essencial de *C. sativum* e frações combinadas F<sub>8-10</sub> estão apresentadas nas Figuras 18a a 22f.

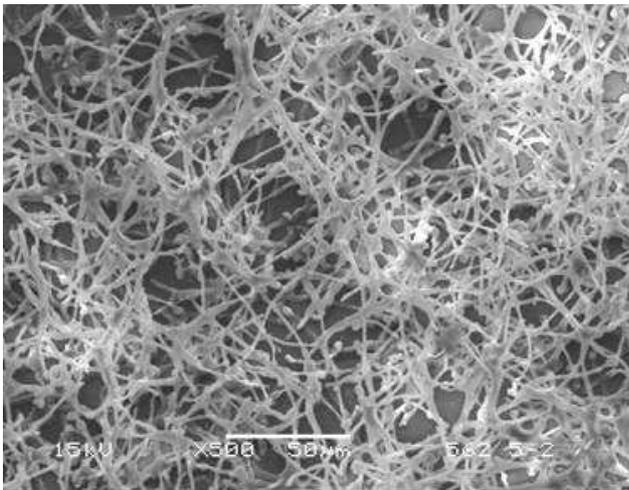
A MEV atuou no presente estudo como uma ferramenta auxiliar qualitativa para que se observasse de maneira ilustrativa (observação de possível alteração morfológica da levedura antes e após receberem tratamento) o que pode ser visualizado de maneira quantitativa através das medidas realizadas pelo aparelho leitor de Elisa (absorbância) das quais pudemos gerar planilhas e obter os gráficos apresentados anteriormente.



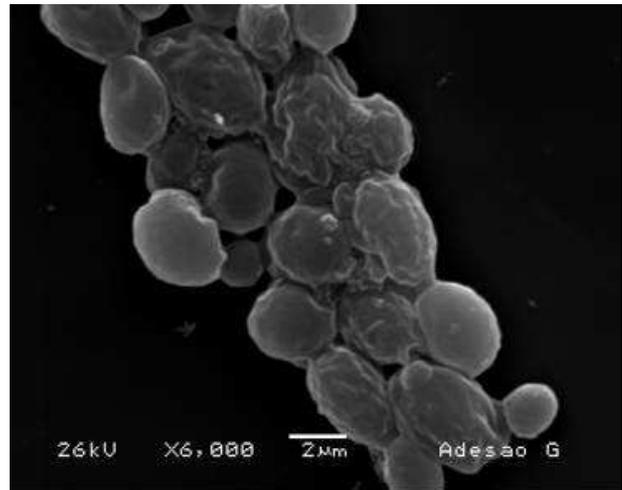
**Figura 18a:** Células da levedura *C. albicans* CBS 562 (MEV - aumento de 3000 x).



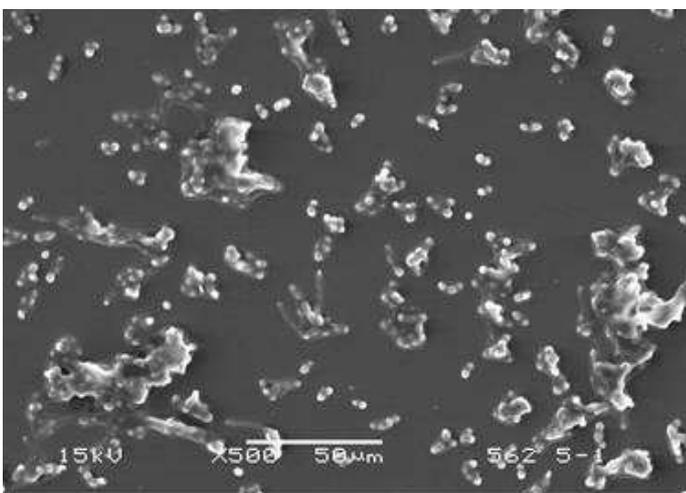
**Figura 18b:** Efeito da nistatina sobre o biofilme de *C. albicans* CBS 562 (MEV - aumento de 500 x).



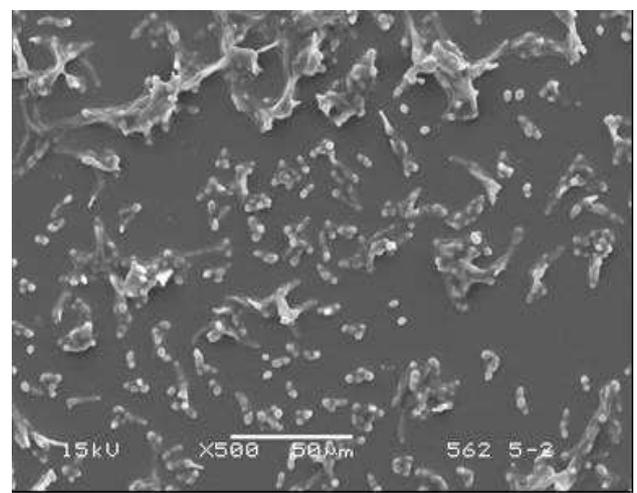
**Figura 18c:** Efeito do fluconazol sobre biofilme de *C. albicans* CBS 562 (MEV - aumento de 500 x).



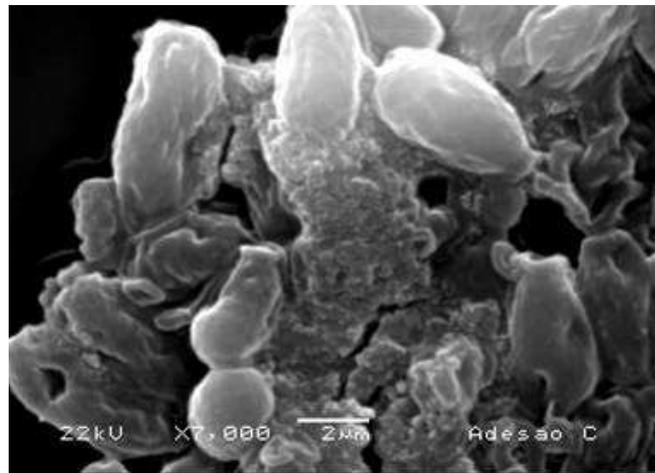
**Figura 18d:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. albicans* CBS 562 (MEV - aumento de 6000 x).



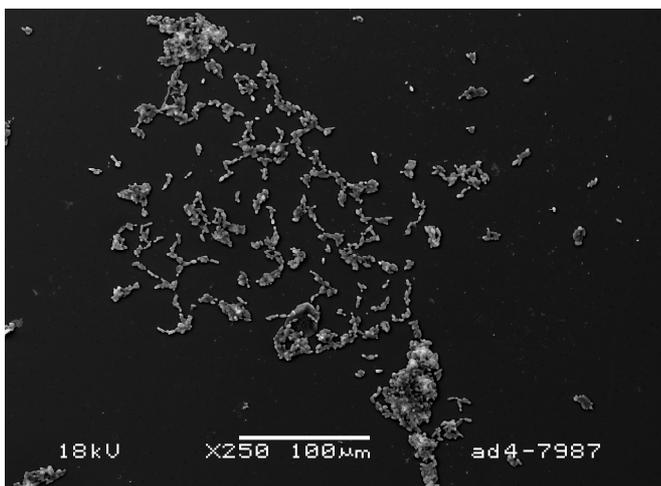
**Figura 18e:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme de *C. albicans* CBS 562 durante 24h (MEV - aumento de 500 x).



**Figura 18f:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme amadurecido de *C. albicans* CBS 562 (MEV - aumento de 500 x).



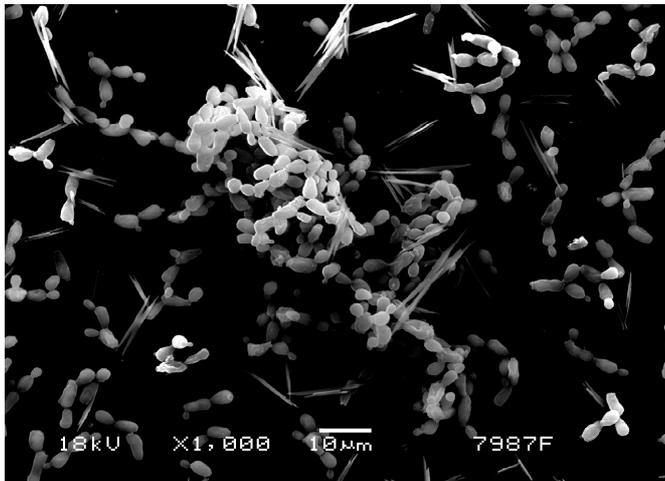
**Figura 18g:** Efeito da fração F<sub>8-10</sub> do óleo essencial de *C. sativum* sobre o biofilme de *C. albicans* CBS 562(MEV - aumento de 7000 x).



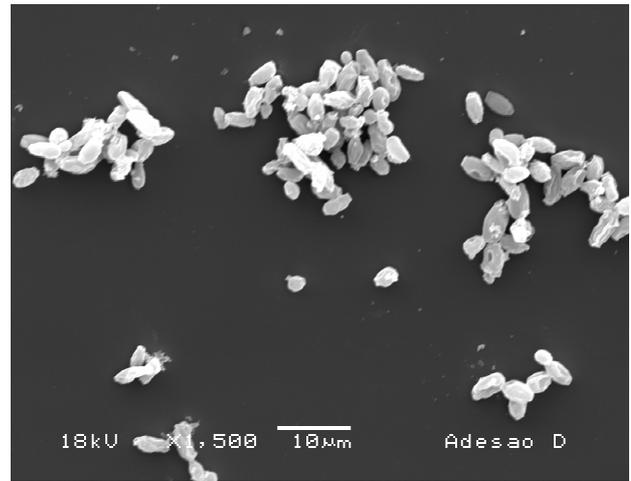
**Figura 19a:** Células da levedura *C. dubliniensis* CBS 7987(MEV - aumento de 250 x).



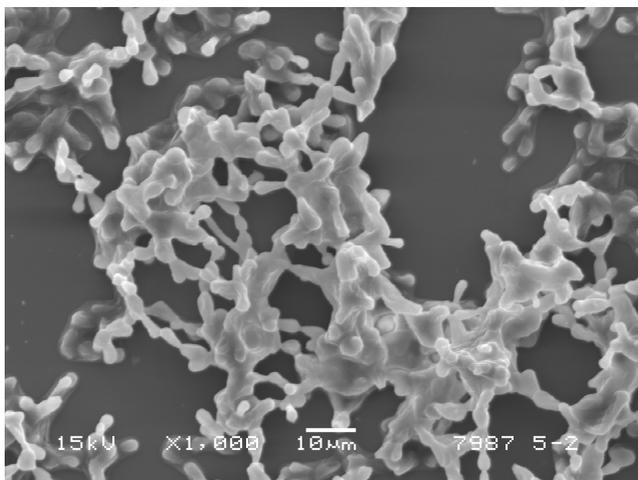
**Figura 19b:** Efeito da nistatina sobre biofilme de *C. dubliniensis* CBS 7987(MEV - aumento de 7500 x).



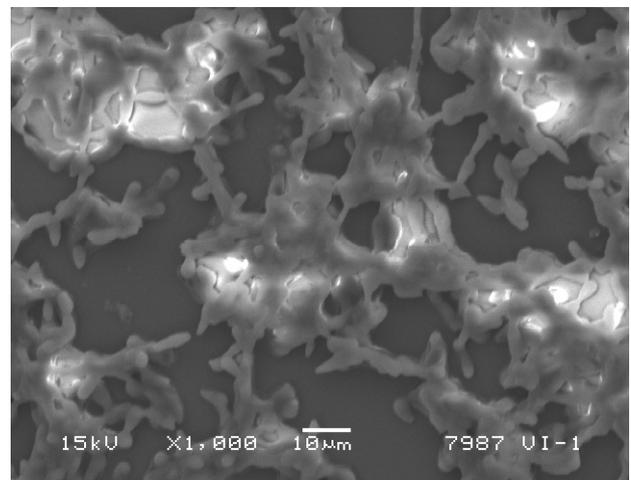
**Figura 19c:** Efeito do fluconazol sobre biofilme de *C. dubliniensis* CBS 7987 (MEV - aumento de 1000 x).



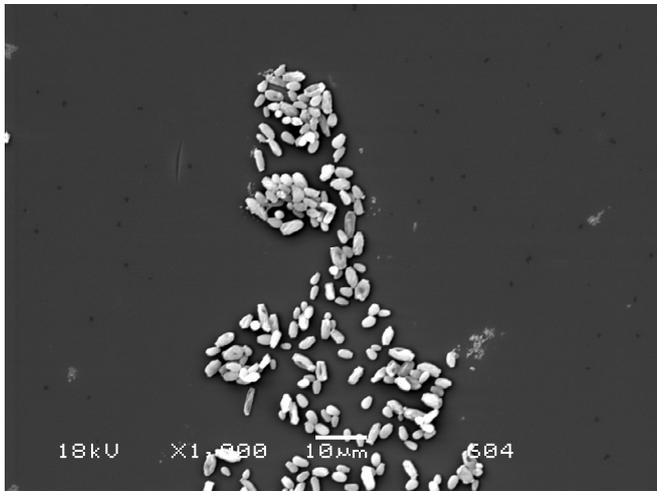
**Figura 19d:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. dubliniensis* CBS (MEV - aumento de 1500 x).



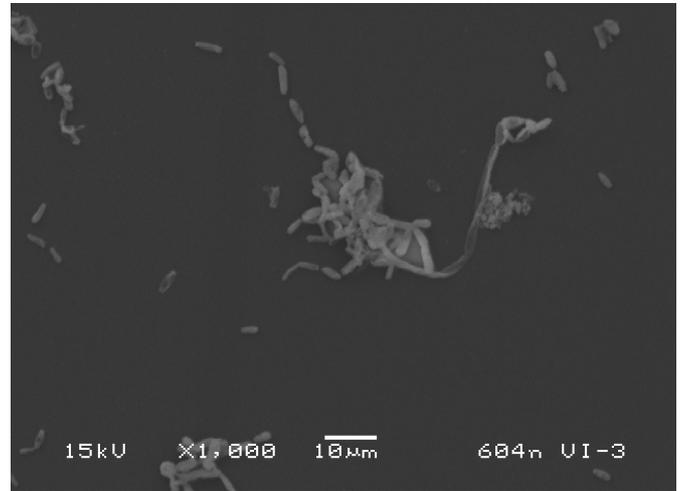
**Figura 19e:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme de *C. dubliniensis* CBS 7987 durante 24h (MEV - aumento de 1000 x).



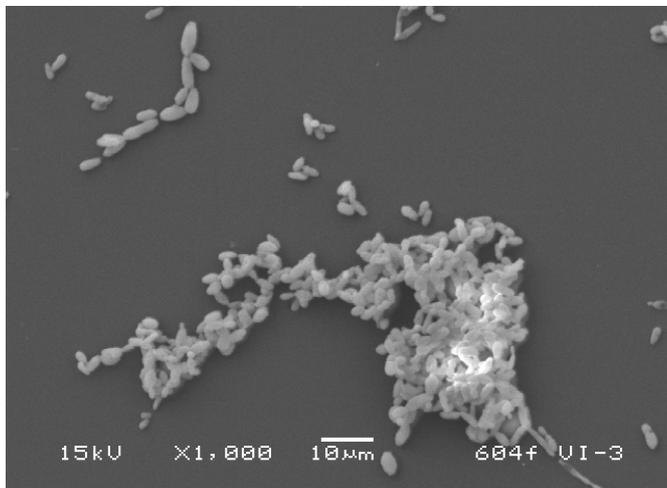
**Figura 19f:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme amadurecido de *C. dubliniensis* CBS 7987 (MEV - aumento de 1000 x).



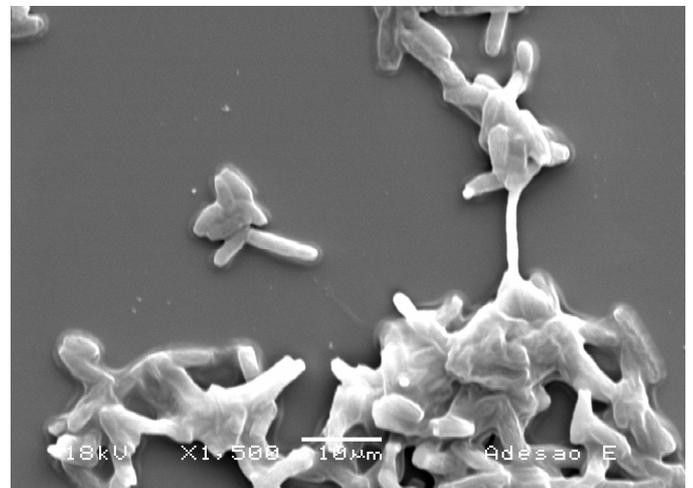
**Figura 20a:** Células da levedura *C. parapsilosis* CBS 604 (MEV - aumento de 1000 x).



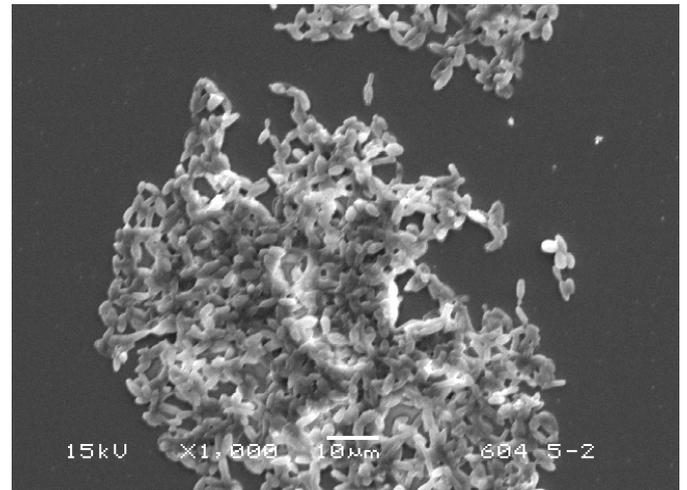
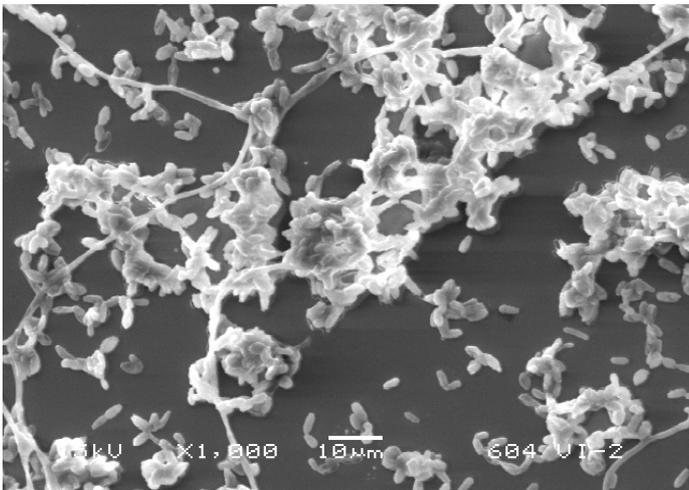
**Figura 20b:** Efeito da nistatina sobre biofilme de *C. parapsilosis* CBS 604 (MEV - aumento de 1000 x).



**Figura 20c:** Efeito do fluconazol sobre biofilme de *C. parapsilosis* CBS 604 (MEV - aumento de 1000 x).

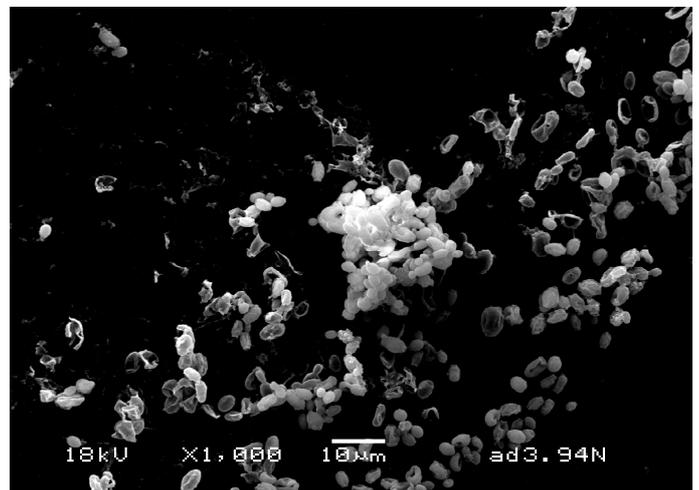
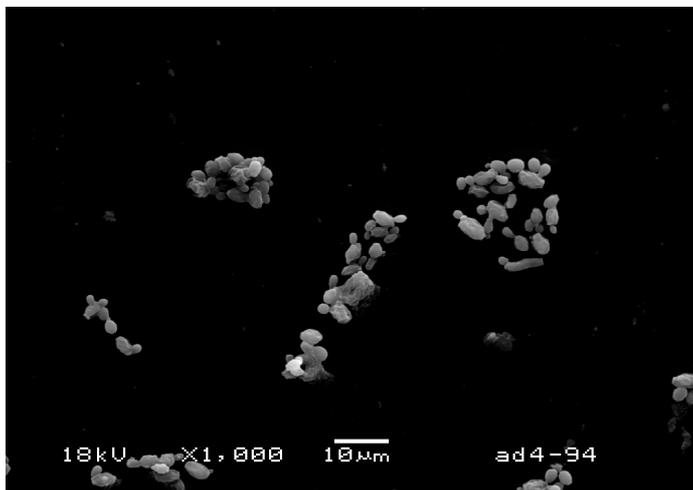


**Figura 20d:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. parapsilosis* CBS 604 (MEV - aumento de 1500 x).



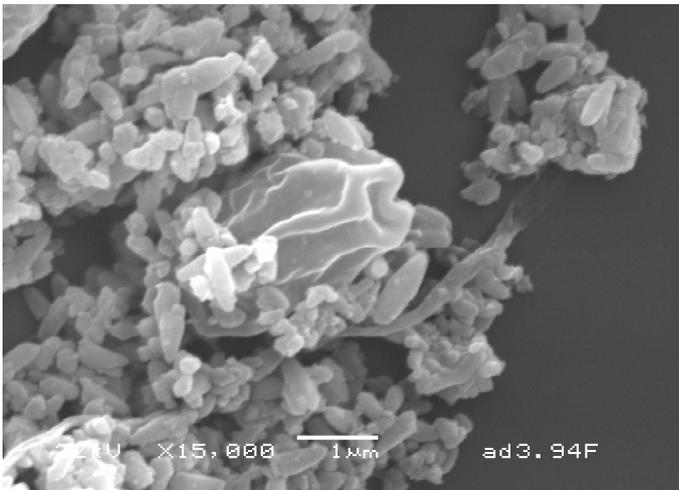
**Figura 20e:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme de *C. parapsilosis* CBS 604 durante 24h (MEV - aumento de 1000 x).

**Figura 20f:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme amadurecido de *C. parapsilosis* CBS 604 (MEV - aumento de 1000 x).

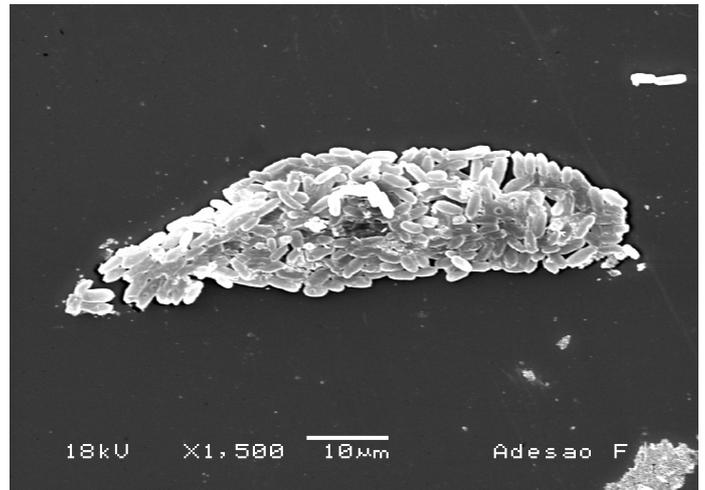


**Figura 21a:** Células da levedura *C. tropicalis* CBS 94 (MEV - aumento de 1000 x).

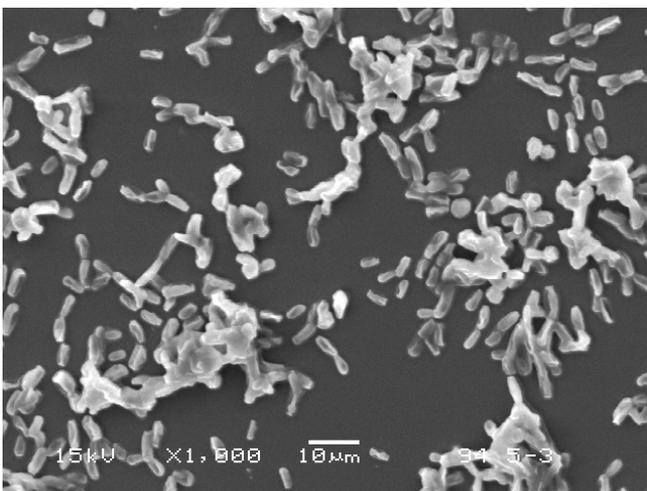
**Figura 21b:** Efeito da nistatina sobre biofilme de *C. tropicalis* CBS 94 (MEV - aumento de 1000 x).



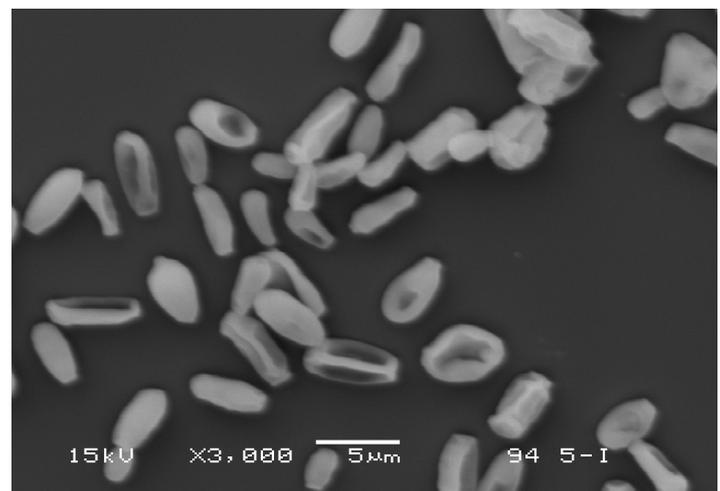
**Figura 21c:** Efeito do fluconazol sobre biofilme de *C. tropicalis* CBS (MEV - aumento de 15.000 x).



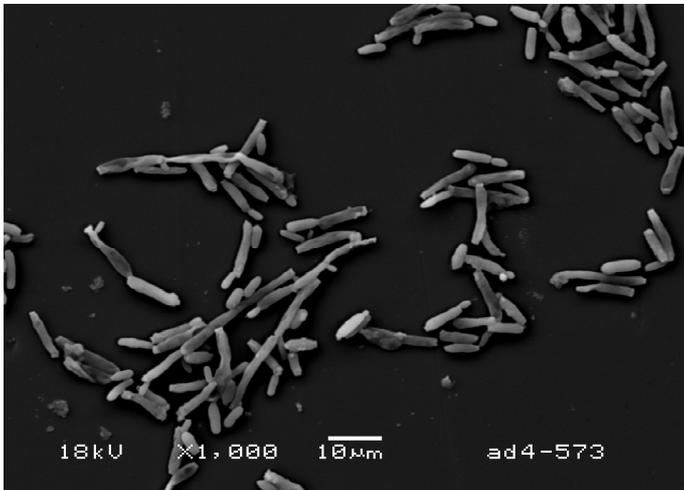
**Figura 21d:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. tropicalis* CBS 94 (MEV - aumento de 1500 x).



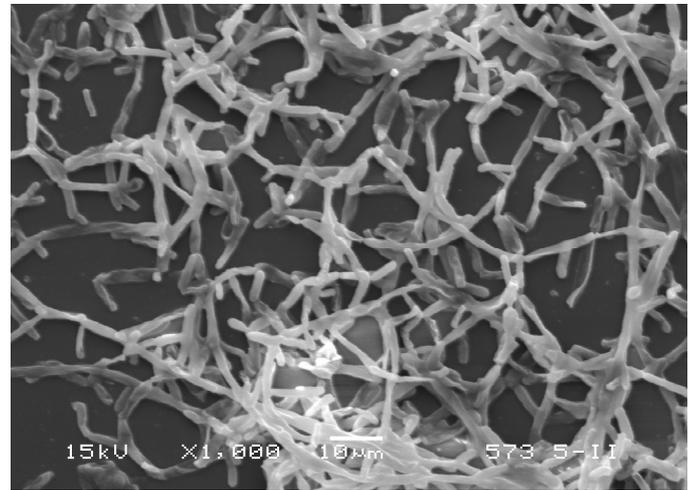
**Figura 21e:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre Biofilme de *C. tropicalis* CBS 94 durante 24h (MEV - aumento de 1000 x).



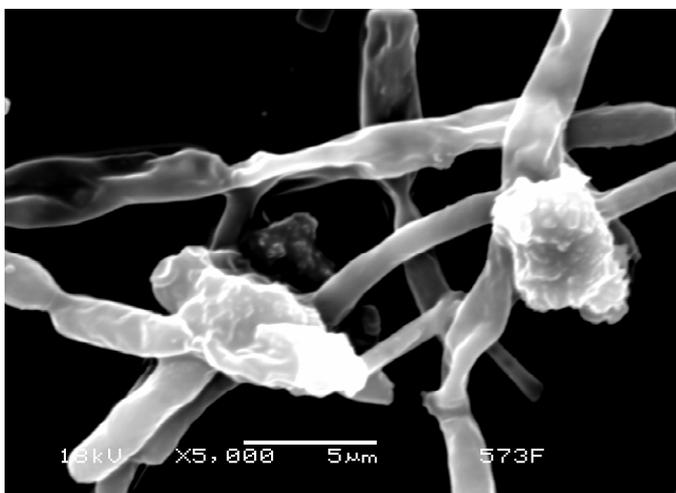
**Figura 21f:** Efeito do óleo essencial de *C. sativum* sobre biofilme amadurecido de *C. tropicalis* CBS (MEV - aumento de 3000 x).



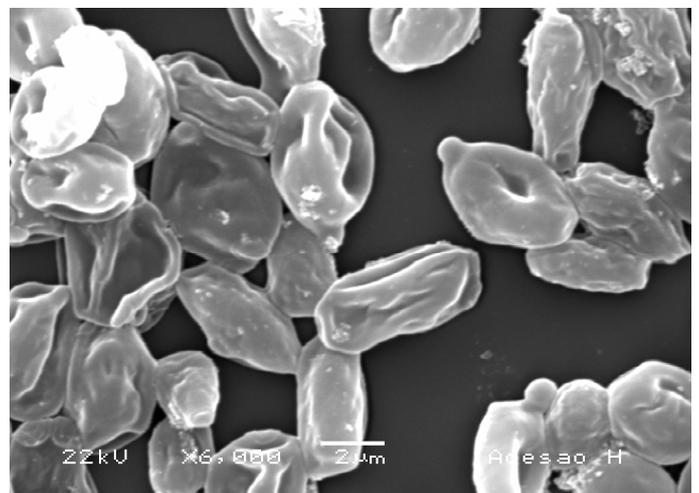
**Figura 22a:** Células da levedura *C.krusei* CBS 573 (MEV - aumento de 1000 x).



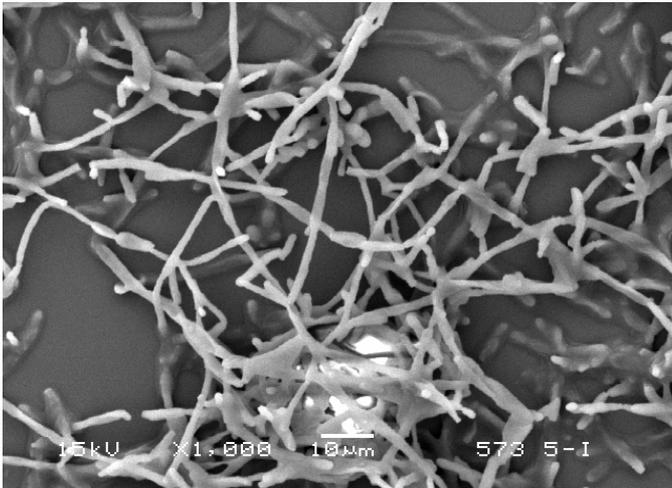
**Figura 22b:** Efeito da nistatina sobre biofilme de *C.krusei* CBS 573 (MEV - aumento de 1000 x).



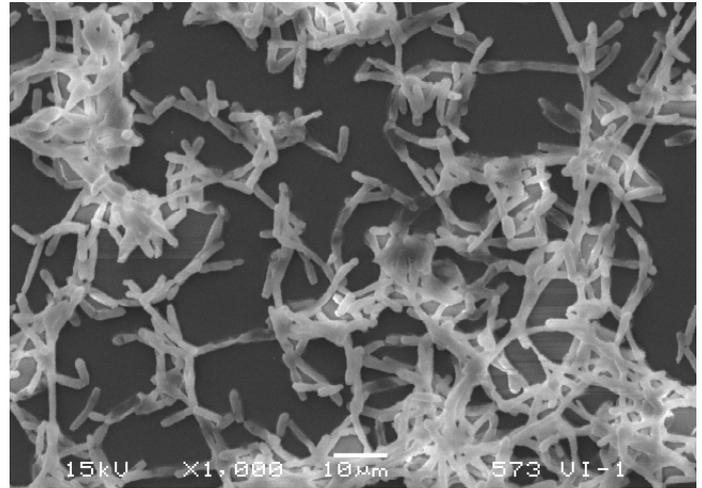
**Figura 22c:** Efeito do fluconazol sobre biofilme de *C.krusei* CBS 573 (MEV - aumento de 5000 x).



**Figura 22d:** Efeito do óleo essencial de *C.sativum* sobre a pré-adesão de *C. krusei* CBS 573. (MEV - aumento de 6000 x).



**Figura 22e:** Efeito do óleo essencial de *C.sativum* sobre Biofilme de *C.krusei* CBS 573 durante 24h (MEV - aumento de 1000 x).



**Figura 22f:** Efeito do óleo essencial de *C.sativum* sobre biofilme amadurecido de *C.krusei* CBS 573 (MEV - aumento de 6.000 x).

## DISCUSSÃO

O emprego de recursos naturais no tratamento de distintas patologias tem ressurgido com ênfase. Nas últimas décadas, tem-se verificado um aumento na demanda por plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico (Giveon *et al.*, 2004; Mahady, 2001). Daí a necessidade de se inspirar novamente na natureza e de se utilizar substâncias de defesa inatas 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, hexano capaz de separar ácidos graxos, diclorometano capaz de extrair substâncias lipofílicas, como aldeídos, óleos fixos e ceras, seguido da extração com água (hidrodestilação) capaz de retirar aldeídos e álcoois.

Para estudo da atividade anti-*Candida* spp. das plantas medicinais listadas na Tabela 2, foram observados os melhores rendimentos em óleos essenciais para as espécies de *Cymbopogon*, para *C. martinii* e *C. winterianus*, respectivamente, 1,36 e 1,88% (base seca). Menores rendimentos em óleos foram encontrados para *S. chamaecyparissus*, *A. tuberosum* e *C. sativum* com valores de 0,15%; 0,11% e 0,08%, respectivamente (Tabela 3). As plantas medicinais foram também coletadas para obtenção de extrato diclorometano e hexânico e os dados mostram que os rendimentos em extratos diclorometânicos mais significativos foram obtidos para *C. winterianus* (14,68%) e *A. tuberosum* (18,50%), seguidos de *S. chamaecyparissus* (10,14%) e *C. martinii* (7,33%). O extrato hexânico de *C. sativum* (1,33%) foi o que apresentou menor rendimento quando comparado aos demais (Tabela 4 e 5).

São vários os fatores que têm sido citados por exercerem influência na obtenção de óleos essenciais e extratos vegetais de plantas medicinais. Os mais típicos são: a variabilidade genética, a idade das folhas, as condições ambientais, o tipo de manejo florestal, os métodos utilizados para amostragem das folhas e os processos de extração e de análise.

Os dados de rendimento em óleo essencial obtidos no presente trabalho corroboram com os encontrados por Duarte *et al.* (2005), sendo as espécies de *Cymbopogon* e de *A. tuberosum* as de maior e menor rendimento, respectivamente.

Em contrapartida, Melo *et al.* (2003) obtiveram a extração de compostos apolares, de polaridade intermediária e elevada em quantidade variada, em função do solvente utilizado, sendo as respectivas massas 420, 340 e 3500 mg para extratos etéreo, etanólico e aquoso. O extrato aquoso apresentou um rendimento significativamente superior aos demais, comprovando, portanto, a eficácia deste solvente, que certamente foi maximizada pela utilização de material previamente desidratado. Este resultado, segundo Julkunen-Tiitto (1985), é devido à predominância de compostos fenólicos em vegetais, os quais, em sua maioria, são solúveis em solventes polares. Por outro lado, a quantidade de material extraído pode ainda ter sido influenciada pela composição química do substrato e a técnica de extração (Depkevicius *et al.*, 1998).

Os testes realizados para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Tabela 7), demonstram os resultados de concentração mínima inibitória (MIC), onde destacamos o *C. sativum*, que inibiu todos os isolados testados, com MIC(s) até 0,5 mg/mL. O óleo essencial de *C. martinii* também apresentou MIC(s) até 0,5 mg/mL exceto para quatro isolados, cujos valores de MIC(s) foram maiores ou iguais a 1,0 mg/mL. Em um trabalho anterior (Duarte *et al.*, 2005), definiu com base em Aligiannis *et al.* (2001), que concentrações mínimas inibitórias (MIC) de até 0,5%, de 0,55 a 1,5% e acima de 1,5% representam, respectivamente, forte, moderada e fraca atividade antimicrobiana. Desse modo, podemos considerar que o óleo essencial da planta *C. sativum* mostrou forte atividade antimicrobiana para todos dos isolados de *Candida spp.* Já para *C. martinii*, o óleo essencial também demonstrou forte atividade antimicrobiana, exceto para quatro isolados, 1 de *C. dubliniensis* e 3 de *C. tropicalis*, cuja atividade pode ser classificada como moderada (Tabela 7) e isso indica que esses materiais vegetais podem vir a ser utilizados em novas formulações de fitofármacos levando-se em conta o potencial antifúngico que os mesmos apresentaram.

O óleo essencial de *A. tuberosum* apresentou forte inibição para as cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e para um único isolado de *C. krusei* (56M3) com valores de MIC iguais ou menores a 0,5 mg/mL. Contra os isolados da espécie de *C. dubliniensis* e dois isolados de *C. krusei* (56M4 e 56M6) essa substância demonstrou atividade moderada, enquanto para as cepas de *C. tropicalis* e para *C. krusei* CBS 573, o mesmo apresentou fraca atividade antimicrobiana. Os óleos das demais plantas estudadas mostraram atividade moderada para todas as espécies, exceto para quatro isolados de *C. tropicalis* cuja atividade foi considerada fraca (Tabela 7). Quando os extratos diclorometânico e hexânico das mesmas plantas foram testados frente aos isolados orais de *Candida* spp, o extrato de maior inibição foi o extrato hexânico de *C. sativum* ( MIC 0,002 a 1mg/mL) seguido dos extratos diclorometânicos de *C. martinii* (MIC 0,007 a > 1mg/mL), *C. winterianus*, (MIC 0,007 a > 1mg/mL) *S. chamaecyparissus* (MIC 0,015 a > 1mg/mL) e finalmente do extrato diclorometânico de *A. tuberosum* (MIC 0,015 a > 1mg/mL) (Tabela 8).

Vários fatores contribuem para as divergências nos resultados obtidos com extratos 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 (Marques & Caixeta, 2002).

Stefanini *et al.* (2001) em trabalho similar de verificação de atividade antimicrobiana avaliou óleos essenciais das sementes de quatro espécies de Apiaceae (funcho, endro, cominho e coentro) os quais foram testados sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, e *Salmonella* spp., isolados de casos clínicos humanos do Hospital da Faculdade de Medicina da UNESP-Botucatu/S.P. O autor observou que o óleo essencial de *C. sativum* foi ativo apenas sobre *Salmonella* spp., com halo de inibição de 18 mm. Essa diferença de efetividade do óleo essencial de *C. sativum* pode estar atribuída à parte da planta a qual o óleo essencial foi extraído, visto que no presente estudo as extrações foram realizadas de folhas frescas, enquanto Stefanini *et al.* (2001) realizou as extrações com sementes. A vasta diversidade de compostos ativos existentes dentro de uma mesma espécie

considerando a parte da planta da qual o material vegetal foi extraído pode ser um fator a ser considerado na observação de resultados compatíveis.

Kim *et al.* (2008) demonstraram que além da efetividade antimicrobiana de *C. sativum* os óleos essenciais e compostos ativos desta espécie, e de *Liquidambar orientalis* e *Valeriana wallichii* parecem ser úteis como nematicidas naturais para *Bursaphelenchus xylophilus*, um nemátoda da madeira do pinheiro que ataca o sistema de circulação da árvore, enfraquecendo-a e tornando-a mais susceptível ao ataque de outras pragas. Para a utilização prática dos três óleos essenciais e seus compostos como novos nematicidas, estudos mais aprofundados visando aperfeiçoar a ação sistêmica, fitotoxicidade, a estabilidade da droga e possibilidade de redução do custo são desejados.

Ressaltando os potenciais antimicrobianos encontrados em nosso estudo verificamos que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais das plantas medicinais foi, em geral, mais efetiva do que a dos extratos estudados. Duarte (2006) evidenciou em trabalho similar que os óleos essenciais apresentaram ação sobre um maior número de microrganismos do que os extratos etanólicos estudados, com melhor atividade antimicrobiana, salientando que apenas os extratos de *Mikania glomerata* e *M. laevigata* foram capazes de inibir as bactérias *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. faecium*, com valores de MIC de 0,04 a 0,1 mg/mL, concentrações similares a do cloranfenicol (0,12 mg/mL). Cita ainda que o fato dos óleos essenciais terem sido mais abrangentes quanto à atividade antimicrobiana já é um dado esperado, uma vez que as substâncias obtidas pelos tipos de extração utilizados são de classes químicas distintas. Porém, ressalta que a maioria dos óleos estudados apresentaram atividade antimicrobiana contra as mesmas bactérias inibidas pelos extratos. Esses achados corroboram com os dados encontrados no presente trabalho em relação a algumas plantas medicinais estudadas como *A. tuberosum*, *C. martini* e *C. winterianus*, ressaltando os mesmos potenciais antimicrobianos.

Duarte (2006) citou a não existência de um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram como um bom potencial mesmo aqueles com concentrações inibitórias superiores. Ressalta ainda os valores de MIC e respectivas capacidades de inibição propostos por Aligianis *et al.* (2001) para materiais vegetais citados anteriormente. A autora salientou ainda que, 11 das 80 espécies medicinais estudadas apresentaram

potencial de uso como antimicrobiano, com inibições importantes, como a observada para *A. tuberosum* – folhas/*C. albicans* (MIC de 0,03 mg/mL). Dentre os 13 sorotipos de *E. coli* estudados, 12 foram inibidos pela *A. triphylla* e 11 por *C. martini* e *C. winterianus*, com MICs entre 0,1 e 0,9 mg/mL, enquanto cinco espécies medicinais foram capazes de inibir os isolados clínicos orais da levedura *C. albicans*, com MICs entre 0,1 e 0,8 mg/mL. Afirma no final do estudo que o óleo essencial da espécie *S. chamaecyparissus* foi apto para inibir a maioria dos microrganismos estudados na ocasião do estudo.

Condizendo aos nossos resultados obtidos em relação ao óleo de *S. chamaecyparissus*, que apresentou boa atividade de inibição, Suresh *et al.* (1997) revelaram que o óleo essencial de Santolina possuía grande atividade antifúngica contra *C. albicans* apresentando valores de concentração inibitória mínima (MIC) entre 62,5 a 125 µg / mL. Notamos ainda que os valores de MIC obtidos pelos autores são consideravelmente maiores aos encontrados na presente pesquisa e, portanto, pode-se salientar o maior potencial antifúngico do óleo de Santolina obtidos na presente pesquisa quando comparado aos encontrados pelos autores referidos. Suresh *et al.* (1995) em pesquisa preliminar com esta mesma planta, já a descrevem como significativamente eficaz no controle de candidíase superficial e sistêmica, portanto, atribuindo-a grande atividade antifúngica. Os autores ressaltaram que houve efeito sinérgico do óleo essencial de Santolina e clotrimazol no controle de *C. albicans in vitro*, e esta também foi capaz de controlar micoses cutâneas superficiais. Acrescentam ainda, que estudos sobre o óleo essencial de Santolina como antifúngico são claramente indicados, visto o potencial clínico da planta, já que o principal fator que tem estimulado a busca por agentes antifúngicos mais seguros e eficazes tem sido o aumento da incidência sistêmica de micoses em indivíduos imunologicamente comprometidos associado à incidência de certas cepas resistentes de *C. albicans* aos antifúngicos azólicos. Dessa forma os autores evidenciam a necessidade do desenvolvimento de uma maior variedade de antifúngicos para o tratamento de doenças fúngicas. Esses relatos em associação àqueles obtidos em nossa pesquisa, permitem considerar sobre a importância das plantas como uma alternativa sólida do emprego das mesmas como antifúngico.

Os resultados de melhor atividade do óleo essencial de *C. sativum* obtidos no presente trabalho, levou ao fracionamento dessa substância em coluna seca onde foram obtidas 10 frações (Figura 1). As frações foram então reagrupadas, levando-se em conta o grau de similaridade detectado nos padrões das bandas apresentadas na CCD

(cromatografia em camada delgada - Figura 1). As frações 3 e 4 foram agrupadas em uma única fração, bem como as frações 8 a 10. Já, as frações 1 e 2 não apresentaram atividade contra as leveduras testadas.

Os resultados referentes às atividades das frações do óleo essencial de *C. sativum* estão apresentados na Tabela 9. Os dados mostram que tanto o óleo bruto como as frações apresentaram forte atividade antimicrobiana contra os isolados de *Candida* spp., como pode ser observado pelos valores de MIC obtidos. O óleo essencial bruto de *C. sativum* e principalmente as frações 8-10 apresentaram MIC(s) similares às observadas para as drogas antifúngicas utilizadas como padrão (Tabela 10). Isso demonstra o potencial de aplicação desta planta como antifúngico, contribuindo para reforçar o interesse das indústrias de fitofármacos na obtenção de produtos naturais, como uma alternativa de agente antimicrobiano que também possa ser economicamente viável.

Estes dados reafirmam a importância de levantamentos etnofarmacológicos na seleção de plantas para triagem de bioatividade. Os resultados apresentam uma expressiva contribuição para a caracterização da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas da flora brasileira utilizados na medicina tradicional.

Para comparar os resultados de atividade inibitória obtidos a partir das plantas medicinais estudadas com a de antifúngicos disponíveis comercialmente, foram escolhidos a nistatina (poliênico - fungicida) e o fluconazol (azólico fungistático). Para os testes foram escolhidas todas as cepas padrões e apenas os isolados clínicos que mostraram maior desenvolvimento em biofilme (Figuras 2 a 6). Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Os dados mostraram que 12 dos 21 isolados de *Candida* spp foram sensíveis ao fluconazol, 6 isolados apresentaram suscetibilidade dependente de concentração e apenas 3 demonstraram ser resistentes. Em relação à nistatina, 13 isolados mostraram ser sensíveis e 8 apresentaram resistência em relação a essa droga.

Condizendo com os achados em relação aos antifúngicos azólicos, Furletti *et al.* (2008) demonstraram que a ocorrência de resistência para os antifúngicos azólicos foi maior para o grupo das espécies de *Candida* não-*albicans* (42,8%) em relação ao observado para *C. albicans* (3,6%). Foi observada a ocorrência de resistência cruzada entre os antifúngicos itraconazol e cetoconazol, para cinco amostras de três pacientes. Embora a ocorrência de resistência fosse baixa para os azólicos, observou-se uma diminuição na susceptibilidade a estes antifúngicos, demonstrada pelo elevado índice de

SDC (susceptibilidade depende de concentração), especialmente para itraconazol e cetoconazol. O fluconazol mostrou ser o antifúngico mais efetivo para a maioria das amostras dentre todas as espécies de *Candida* testadas. Estudos têm demonstrado que a suscetibilidade aos antifúngicos azólicos entre isolados de *Candida* spp. de bolsas periodontais pode ser variável, ocorrendo resistência cruzada. Muñoz *et al.* (1997) também destacaram a ocorrência de resistência cruzada entre os antifúngicos azólicos, fundamentada na presença de mecanismos de ação similares. Isso demonstrou padrões diferentes de suscetibilidade das mesmas cepas às drogas testadas (Arikan *et al.*, 1995). Esses dados, quando comparados, parecem ser indicativos de crescente resistência entre espécies de *Candida* aos antifúngicos azólicos, sugerindo que a cavidade oral poderia ser um reservatório de leveduras resistentes (Waltimo *et al.*, 2000; Kutsyk & Pavliuk, 2003; Ito *et al.*, 2004; Kuriyama *et al.*, 2005).

Consequentemente um correto diagnóstico microbiológico deve ser considerado em lesões periodontais refratárias ao tratamento convencional (raspagem e alisamento radicular). A aplicação conjunta de tratamento antifúngico pode ser útil em casos de infecções oportunistas por *Candida* spp. no periodonto, especialmente em pacientes com elevado risco de desenvolver candidíase sistêmica (Pizzo *et al.*, 2000). A elevada ocorrência de resistência a Anfotericina B encontrada entre as espécies analisadas indica a necessidade de se fazer estudos mais acurados para este antifúngico. Realmente, considerando o potencial fungistático dos antifúngicos azólicos e o potencial fungicida da anfotericina B (antifúngico poliênico), seria esperado encontrar maior número de isolados sensíveis a esta última droga e não às demais.

Considerando a literatura pertinente, constatou-se que não existe um padrão usual de comportamento de isolados clínicos em relação à suscetibilidade aos antifúngicos testados, 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 fluconazol e anfotericina B foi equivalente.

Desta forma, os resultados obtidos em diversas pesquisas podem ser sugestivos da ocorrência de seleção de cepas resistentes a alguns antifúngicos azólicos e poliênicos. O mesmo não tem acontecido com a forma de apresentação lipossomal da anfotericina B, cuja formulação permite a liberação gradual, embora constante, do princípio ativo. Tal formulação tem sido considerada como uma melhor opção terapêutica nos casos de resistência. Com isso, observa-se a importância da identificação preliminar do

microrganismo causador da doença para que se prescreva a droga e concentração apropriada da mesma, evitando dessa maneira a seleção de cepas resistentes (Magaldi, 2001; Paniagua *et al.*, 2002; Marra & Camargo, 2002).

Concomitante aos testes de atividade com os óleos essenciais e extratos vegetais, realizamos testes empregando biofilmes das espécies de *Candida* com a finalidade de verificar o padrão de desenvolvimento dos mesmos. O padrão de desenvolvimento dos biofilmes após 24 h de incubação a 37 °C está representado nas Figuras 2 a 6.

De acordo com os resultados observamos que dentre as espécies estudadas, a *C. albicans* foi a que apresentou maior desenvolvimento em biofilme após 24 h, principalmente os isolados 562 e 13A5 (Figura 2), seguido de *C. tropicalis* (isolados 94 e 53M6 - Figura 5). *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* apresentaram padrões similares de desenvolvimento (Figuras 3 e 4), e *C. krusei* foi a espécie que apresentou menor desenvolvimento em biofilme (Figura 6). Assim, com base nos resultados, elegeram-se 10 das 21 cepas de levedura, levando-se em conta a viabilidade celular para os testes de atividade sobre o biofilme, utilizando o óleo essencial e frações de *C. sativum* devido aos melhores resultados que estes apresentaram frente às células planctônicas. As cepas padrão escolhidas para os testes foram *C. albicans* CBS 562, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. parapsilosis* 604, *C. tropicalis* 94 e *C. krusei* 573, além dos isolados clínicos *C. albicans* 13A5, *C. dubliniensis* 26A3, *C. parapsilosis* 45M4, *C. tropicalis* 53M7 e *C. krusei* 56M3.

Kirkpatrick *et al.* (2000) demonstraram que há interação entre os diferentes microrganismos presentes no biofilme e revela que isso pode ter um impacto sobre a colonização e subseqüentes infecções. Demonstraram que os microrganismos puderam aglutinar-se uns aos outros promovendo um processo de adesão e também puderam competir uns com os outros e isso resultar em redução na aderência. Evidenciaram que o biofilme de *C. albicans* por vezes coexiste em uma mistura heterogênea com outras *Candida* spp. ou bactérias. A questão não muito bem elucidada e que ainda precisa ser respondida é se a presença destes microrganismos afeta a formação do biofilme por *C. albicans* e vice-versa. *Candida albicans* apresentou uma vantagem na competição com *C. dubliniensis* tanto em culturas em caldo quanto sobre o desenvolvimento de biofilme (Kirkpatrick *et al.* 2000, El-Azzi *et al.*, 2004).

Em descobertas semelhantes, El-Azzi *et al.* (2004) concluíram que *C. albicans* tem capacidade de se aglutinar com outras bactérias e fungos o que pode resultar em biofilmes heterogêneos. Atribui que este fenômeno pode ser dependente de fatores inter e

intra-espécies, tais como variações de açúcares, e componentes da parede celular bacteriana (Branting *et al.*, 1989). Holmes *et al.* (1995b) constataram que independentemente do mecanismo envolvido a heterogeneidade do biofilme pode ter um impacto sobre a terapia antimicrobiana e sobre a resposta do biofilme causador de infecções a essas terapias.

Essas considerações permitem sugerir que a espécie de *C. albicans* pode estar associada a outras espécies microbianas na forma de biofilme e este fato pode estar relacionado à sua prevalência na cavidade oral.

Nos estudos relacionados à atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. sativum* frente ao biofilme de isolados orais de *Candida* spp. foram analisados os resultados por espécie, avaliando-se as diferentes condições de aplicação do material vegetal.

Inicialmente foi realizada a curva de crescimento planctônico de *C. albicans* CBS 562 e isolado clínico 13A5 (Figura 7a). Nesse experimento observou-se similaridade no crescimento até aproximadamente 24h. A partir desse tempo nota-se que o crescimento da cepa CBS 562 apresentou um pico após 30h e um declínio entre 35 e 40h. O gráfico sugere que houve um período de adaptação das células ao meio de cultura (fase lag) seguido da fase log e declínio.

Em relação à curva de crescimento do biofilme de *C. albicans* CBS 562 e isolado clínico 13A5, pode-se observar que houve semelhança na formação do mesmo, porém o biofilme de CBS 562 demonstrou maior crescimento, podendo-se constatar que essa cepa tem maior potencial para desenvolvimento de biofilme quando comparada ao isolado clínico 13A5 (Figura 7b).

Na Figura 7c está demonstrada a cinética de crescimento do biofilme de *C. albicans* 562 (48h) na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum* com aplicações das drogas a intervalos de 6 h. Pode-se notar que nas 6 h iniciais, há uma estabilidade celular das leveduras (CBS 562 e 13A5) quando na presença de nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* (1mg/mL) o que pode estar ligado ao fato da atuação dessas drogas antes mesmo que as células terminem de se aderir (Figuras 7c e 7d). Na presença das drogas nota-se também que os picos de crescimento celular se apresentam inferiores em relação à curva de crescimento controle, exceto para o isolado 13A5 (7b).

Nos testes de cinética de crescimento (tanto para as cepas CBS 562 como para o isolado clínico 13A5) verifica-se que a nistatina foi a droga mais eficiente no controle de

crescimento do biofilme. Isso ocorreu da mesma forma para o óleo essencial de *C. sativum* na concentração de 1 mg/mL.

Os efeitos da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* nas concentrações descritas acima foram comparados também com os da fração F<sub>8-10</sub> do óleo essencial na concentração de 1 mg/mL (Figuras 7e, 7f), visando avaliar os possíveis efeitos sobre a pré-adesão de *C. albicans* (CBS-562). Através dos resultados observa-se que quando os materiais foram aplicados no tempo inicial (T<sub>0</sub>) não houve inibição efetiva sobre o processo de pré-adesão celular, sugerindo que no início do experimento (tempo T<sub>0</sub>) as leveduras estão ainda se adaptando aos componentes presentes no meio de cultura, possuindo reservas suficientes para iniciar a fase de crescimento. Em seguida, quando ocorreu a reaplicação da nistatina, óleo e frações F<sub>8-10</sub> após 3 horas (T<sub>3</sub>) verificou-se que não houve crescimento até 24 h, o que demonstra que somente com a reaplicação dos materiais foi possível inibir ou estabilizar a pré-adesão, sugerindo um efeito cumulativo tanto da nistatina como dos compostos presentes no óleo e fração F<sub>8-10</sub> de *C. sativum*.

O mesmo ensaio foi realizado com o isolado clínico de *C. albicans* 13A5 (Figura 7f). Através dos resultados verificou-se que houve resposta similar em relação à aplicação dos materiais investigados no tempo inicial (T<sub>0</sub>). Porém, a reaplicação da fração F<sub>8-10</sub> após 3 h de ensaio (T<sub>3</sub>) reduziu a pré-adesão, o que sugere que quando há reaplicação da droga o tratamento se torna mais efetivo porque ajuda a impedir a adesão celular (efeito cumulativo), como se ocorresse um desarranjo na estrutura e impedimento da continuidade de formação do biofilme.

Em seguida, a nistatina, o óleo essencial de *C. sativum* e frações combinadas F<sub>8-10</sub> (1mg/mL) foram aplicadas sobre os biofilmes de *C. albicans* 562 e isolado clínico 13A5 a cada 6 h, durante 24 h (Figuras 7g-7h). Pode-se observar que nessas condições, houve uma evidente diminuição na formação do biofilme em relação ao controle, respectivamente, para óleo, nistatina e fração F<sub>8-10</sub>. A aplicação dos mesmos materiais sobre um biofilme amadurecido (24 h) de *C. albicans* CBS 562 e isolado clínico 13A5 mostrou que as frações combinadas apresentaram melhores resultados em relação às demais drogas testadas (Figuras 7i -7j). As frações combinadas F<sub>8-10</sub> de *C. sativum* apresentaram maior efetividade sobre o desenvolvimento do biofilme, assim como para o controle dos biofilmes amadurecidos comparadas aos demais materiais testados, incluindo o óleo bruto de *C. sativum* (Figuras 7e – 7j).

Em relação a *C. dubliniensis*, as curvas de crescimento planctônico e do biofilme da CBS 7987 e isolado clínico 26A3 foram obtidas para posteriormente serem comparadas com a cinética de crescimento na presença das drogas testadas (Figuras 8a - 8b).

A cinética de crescimento do biofilme de *C. dubliniensis* (CBS 7987) na presença de antifúngicos (nistatina 1mg/mL e fluconazol 0,064mg/mL) e do óleo essencial de *C. sativum* teve um padrão diferente quando comparado ao mesmo experimento realizado com o isolado clínico 26A3. Nesse ensaio foram utilizadas duas concentrações do óleo essencial de *C. sativum*, 0,007mg/mL, que corresponde a MIC para a célula planctônica, e a concentração de 1mg/mL. Pode-se observar que o isolado clínico 26A3 foi mais sensível aos materiais vegetais e drogas sintéticas quando comparado à cepa padrão CBS 7987. Para o isolado 26A3 nota-se uma ação de inibição semelhante para as amostras testadas (Figura 8d). No ensaio realizado com CBS 7987, o fluconazol (0,064mg/mL) foi a droga mais eficiente seguida da nistatina (1mg/mL) e do óleo essencial de *C. sativum* (1mg/mL), após 24h (Figura 8c). Esses resultados demonstram que existe uma diferença de comportamento da CBS 7987 e do isolado clínico 26A3 frente às drogas testadas.

Quando foram avaliadas as drogas em relação à pré-adesão dos isolados de *C. dubliniensis* 7987 e isolado clínico 26A3, a nistatina foi a droga que apresentou maior efetividade na inibição. Verificou-se ainda que quando os dois isolados de *C. dubliniensis* foram submetidos à ação do óleo essencial de *C. sativum*, a efetividade se deu no tempo  $T_3$  (após reaplicação) e isso sugeriu que o reforço da dose é necessário no combate da adesão celular tendo em vista que no tempo  $T_0$  a inibição da adesão não foi eficaz já que houve crescimento celular (Figuras 8e -8f).

Quando os testes foram avaliados sobre biofilmes de *C. dubliniensis* sendo a aplicação da droga realizada em intervalos de 6 h, durante 24 h, observou-se que a nistatina foi a droga mais efetiva para o isolado CBS 7987, porém nenhuma alteração significativa foi observada em relação ao isolado clínico 26A3, visto que não houve diferença no crescimento do biofilme no período de 24 h, para as diferentes condições avaliadas (Figuras 8g - 8h).

Na avaliação dessas drogas testadas sobre biofilme amadurecido (aplicação da droga no tempo 24h), observou-se que houve aumento no desenvolvimento do biofilme da cepa CBS 7987 após este período (48 h). Sob as mesmas condições observou-se inibição

no desenvolvimento do biofilme formado pelo isolado clínico 26A3 de *C. dubliniensis*, tanto para a nistatina como para o óleo essencial de *C. sativum*, ambos a 1mg/mL (Figura 8i - 8j).

Em relação à curva de crescimento planctônico de *C. parapsilosis* CBS 604 e do isolado clínico 45M4, observou-se que o padrão de crescimento foi semelhante até 24h, porém, após esse período, o isolado CBS 604 apresentou crescimento superior ao do isolado clínico 45M4 (Figura 9a).

Quando avaliadas as curvas de crescimento do biofilme desses isolados de *C. parapsilosis*, notou-se que houve um aumento do desenvolvimento do biofilme do isolado clínico no tempo de 20h, porém no período de 30 a 48h o crescimento foi equivalente, o que demonstra que o biofilme de ambas as cepas possuem o mesmo padrão de desenvolvimento ao final de 48h (Figura 9b). Adicionados os antimicrobianos nistatina (1mg/mL) e fluconazol (0,064mg/mL), e o óleo essencial nas duas concentrações estudadas (MIC 0,125 mg/mL para CBS604 e 0,07 mg/mL para 45M4, e 1mg/mL), notou-se que as drogas foram pouco efetivas quando comparadas às curvas padrão (Figura 9b) de ambos os isolados de *C. parapsilosis* CBS 604 e 45M4(Figuras 9c-9d).

Na avaliação do efeito das drogas sobre as células de *C. parapsilosis* na pré-adesão, observou-se que no tempo  $T_0$  a aplicação das drogas não foi eficaz para a cepa padrão CBS 604, mas sim para o biofilme formado pelo isolado clínico 45M4, onde a nistatina conseguiu inibir a pré-adesão (Figura 9e). Após a reaplicação no tempo  $T_3$ , a nistatina mostrou-se eficiente para a cepa CBS 604, porém ineficiente em relação ao isolado clínico. Em ambos os casos tanto para a CBS 604 e isolado clínico 45M4, o óleo essencial de *C. sativum* foi menos eficiente quando comparado a nistatina (Figura 9f).

No ensaio de biofilme avaliado durante 24h para a cepa CBS 604, com aplicação das drogas a cada 6h, notou-se que o óleo essencial de *C. sativum* apresentou efeito intermediário entre o observado para a nistatina e para o controle. Para o isolado clínico 45M4, o efeito do óleo foi semelhante ao da nistatina (Figuras 9g-9h).

Para o experimento de biofilme amadurecido o padrão de crescimento celular foi similar até 24h, tanto para a cepa CBS 604 como para o isolado clínico 45M4. A partir da aplicação da droga no tempo 24 h, tanto o óleo essencial quanto a nistatina apresentaram capacidade inibitória sobre ambas as cepas da espécie de *C. parapsilosis* (Figuras 9i -9j).

O padrão de crescimento planctônico de *C. tropicalis* CBS 94 e do isolado clínico 53M7 foi semelhante (Figura 10a). Já o desenvolvimento do biofilme de ambas as cepas

de *C. tropicalis* apresentou padrões diferentes de crescimento durante o intervalo de tempo de 0 a 48h, sendo que no período final (T 48h) o padrão de crescimento foi equivalente (Figura 10b).

Em relação à cinética de crescimento do biofilme de *C. tropicalis* CBS 94 na presença de nistatina, fluconazol e óleo essencial de *C. sativum* (MIC 0,125mg/mL e 1mg/mL), pode-se observar que não houve um padrão no desenvolvimento do biofilme, porém no tempo de 48 h todas as drogas testadas apresentaram padrão de eficácia semelhante com efeito moderado (Figura 10c). O mesmo padrão de desenvolvimento foi observado para o isolado clínico 53M7. Porém, a nistatina a 1mg/mL mostrou-se mais efetivo quando comparado aos demais materiais testados (Figura 10d).

No ensaio de pré-adesão realizado com *C. tropicalis*, a nistatina mostrou-se eficaz, impedindo parte da adesão celular de ambas as cepas estudadas (CBS 94 e 53M7) no tempo  $T_0$ , assim como o óleo essencial de *C. sativum* foi também capaz de inibir a pré-adesão o que se tornou mais evidente após reaplicação no tempo  $T_3$ , tanto para CBS 94 como para o isolado clínico 53M7. Isso confirma o observado anteriormente de que somente com a reaplicação a intervalos regulares pôde-se notar o controle sobre a adesão celular. Um fato não explicado foi a observação de que a nistatina quando reaplicada na pré-adesão da cepa CBS 94 não surtiu efeito na inibição do crescimento celular quando comparado ao isolado clínico 53M7 (Figuras 10e– 10f).

Quando as drogas foram avaliadas sobre o desenvolvimento do biofilme em intervalos de 6h durante 24h observou-se que o óleo essencial de *C. sativum* apresentou inibição, porém o efeito da nistatina foi superior. Levando-se em conta a pequena diferença de absorvância final entre as condições estudadas, podemos inferir que tanto o óleo como a nistatina agiram de maneira semelhante sobre o desenvolvimento do biofilme das cepas CBS94 e 53M7 (Figuras 10g-10h).

A aplicação no biofilme amadurecido (após 24h) mostrou que o óleo essencial de *C. sativum* produziu um aumento na tendência de formação do biofilme em ambas as leveduras CBS 94 e 53M7. A nistatina apresentou inibição marcante apenas para o isolado clínico 53M7 (Figuras 10i-10j).

A curva de crescimento planctônico de *C. krusei* 573 e do isolado clínico 56M3, assim como a curva de crescimento do biofilme das mesmas leveduras apresentaram padrões de desenvolvimento semelhante entre eles, dentro de cada experimento (Figuras 11a -11b).

Ao avaliar a cinética de crescimento do biofilme de *C. krusei* tanto para a cepa CBS 573 como para o isolado clínico 56M3 na presença de antifúngicos e do óleo essencial de *C. sativum* durante 48h, notou-se de forma geral, que não houve inibição no desenvolvimento do biofilme das leveduras (Figuras 11c -11d).

Analisando o efeito da nistatina e do óleo essencial de *C. sativum* sobre a pré-adesão de *C. krusei* CBS 573 e do isolado clínico 56M3, observou-se que após a reaplicação no tempo T<sub>3</sub> houve diminuição da adesão celular para todas as drogas testadas, para ambas as leveduras. Porém, os melhores efeitos foram obtidos pela nistatina e óleo essencial de *C. sativum* quando aplicados simultaneamente no T<sub>0</sub> e T<sub>3</sub> (Figuras 11e - 11f).

Avaliando o biofilme de 24h onde houve aplicação dos materiais estudados a cada 6h, notou-se que a nistatina foi a droga mais eficaz no controle do desenvolvimento do biofilme de *C. krusei*, seguida do óleo essencial (Figuras 11g – 11h). O mesmo efeito pôde ser notado no biofilme amadurecido. Neste caso, o óleo essencial apresentou ainda considerável ação sobre a desestruturação dos biofilmes de *C. krusei*, principalmente para a cepa CBS 573 (11i – 11j).

Observou-se ao final de todos os ensaios de biofilmes de *Candida* spp., comportamentos diferenciados entre isolados clínicos e cepas padrão, verificando-se respostas diferentes das mesmas frente às substâncias antimicrobianas testadas, sejam elas de origem sintética ou vegetal. Em geral, os isolados clínicos foram mais resistentes que as cepas padrão, uma vez que os mesmos estão sujeitos a uma gama de antimicrobianos na cavidade oral, que acabam por selecionar espécies mais resistentes. Esta seleção pode ocorrer em consequência de uma mutação gênica, proveniente de uma deleção no DNA do microrganismo, ou ainda através de recombinação gênica, na qual as espécies menos resistentes acabam por incorporar em seu material genético, segmentos de DNA de outros microrganismos que possuem o gene de resistência a determinado antimicrobiano.

O fato das drogas antifúngicas e do óleo essencial de *C. sativum* terem demonstrado ação similar sobre o biofilme, parece estar relacionado à ação inibitória dos mesmos sobre as células planctônicas, que foram impedidas de se agregarem ao biofilme. A ação exibida pelo óleo essencial de *C. sativum* mostrou que o mesmo apresenta um grande potencial para uso como antimicrobiano no tratamento de

candidoses, podendo ser administrados com o objetivo de impedir a aderência celular e consequentemente a formação do biofilme.

Os biofilmes microbianos são notoriamente mais resistentes a uma grande variedade de agentes antimicrobianos do que as células em suspensão, incluindo antibióticos, antisépticos e biocidas industriais (Donlan & Costerton, 2002). Em 1995 foi demonstrado pela primeira vez que o mesmo acontece com os biofilmes formados por *C. albicans*, num estudo onde o biofilme foi formado em discos de material polimérico utilizado no fabrico de catéteres (Chandra, 2003). Nesse estudo, verificou-se que os antifúngicos utilizados são muito menos ativos contra os biofilmes de *C. albicans*, do que contra as células em suspensão, e que as concentrações de antifúngico necessárias para obter 50 % de inibição de atividade metabólica foram 5 a 8 vezes mais elevadas. Estudos subsequentes demonstraram que o mesmo aconteceu para biofilmes de *C. albicans* formados em superfícies celulósicas (Baillie & Douglas 1998, Baillie & Douglas 2003), de poliestireno (Ramage *et al.*, 2001a, Ramage *et al.*, 2001b), silicone (Chandra *et al.*, 2001), poliuretano (Lewis *et al.*, 2002) e acrílico dentário (Chandra, 2003; Mah & O'Toole, 2004).

O estudo de Cardoso (2004) teve como objetivo avaliar o efeito da anfotericina B e do fluconazol em células de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* em suspensão e em biofilme, crescidas em meio com saliva artificial e em RPMI.

Numa análise geral aos resultados obtidos, o autor verificou que todas as cepas de *Candida* que cresceram em suspensão apresentaram elevadas susceptibilidades aos dois antifúngicos utilizados e a gama de valores de MIC obtida esteve de acordo com o definido pelo NCCLS, atual CLSI (MIC < 8µg/mL) para estes antifúngicos (CLSI, 2002). Comparando aos resultados obtidos com os biofilmes das cepas em estudo, nos dois meios de cultura utilizados, o autor verificou que as mesmas apresentaram susceptibilidades inferiores às suspensões das mesmas cepas. Os valores de MIC de fluconazol e anfotericina B dos biofilmes foram cerca de 25 e de 20 vezes superior aos das suspensões, respectivamente. A diminuição da susceptibilidade do biofilme foi explicada pela ocorrência de diversos mecanismos de resistência que ainda não foram totalmente compreendidos. O autor levantou várias hipóteses sobre os mecanismos de resistência dos biofilmes, uma das quais, referida por Douglas (2004), foi a diminuição da taxa de crescimento das células, particularmente as situadas junto à superfície de adesão. Uma baixa taxa de crescimento foi muitas vezes acompanhada de alterações na composição da superfície celular, que, pela expressão de genes de resistência, puderam

afetar a susceptibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos (Donlan & Costerton, 2002, Mah *et al.*, 2004).

Douglas (2004) realizou estudos no sentido de investigar se a matriz formada pelos biofilmes de *C. albicans* teria um papel fundamental na sua resistência aos antifúngicos. Nesses estudos, foram comparadas as susceptibilidades de biofilmes crescidos em condições de agitação (com maior formação de matriz) e sem agitação (com menor produção de matriz) e não se verificaram diferenças significativas na susceptibilidade aos antifúngicos, indicando que a matriz não estaria relacionada com a diminuição da susceptibilidade em biofilmes. Por outro lado, estudos realizados em biofilmes bacterianos também revelaram que o crescimento das células no biofilme é mais lento do que numa cultura suspensa, e que este parâmetro pode determinar a susceptibilidade a antibióticos (Baillie & Douglas, 2000).

Os resultados obtidos por Cardoso (2004) sugerem que a resistência dos biofilmes formados por *C. albicans* e *C. dubliniensis*, tal como nos biofilmes bacterianos, é um processo muito complexo, que inclui uma multiplicidade de fatores, não podendo ser explicado por um simples mecanismo molecular. No seu habitat natural, as leveduras estão associadas em biofilmes e são nitidamente mais resistentes aos antifúngicos do que as células em suspensão (planctônicas), o que em termos clínicos poderia ter sérias implicações. A maior parte das prescrições de antifúngicos são feitas com base em estudos realizados com células em suspensão, sendo as quantidades de antifúngico prescritas, possivelmente inferiores às necessárias para eliminar biofilmes. Por outro lado, é necessário rever as normas do CLSI no sentido de contemplarem ensaios normalizados para estudos com biofilmes.

Outros fatores, tais como a expressão de genes de resistência no biofilme, ou limitações difusionais impostas pela matriz polimérica poderiam explicar a maior resistência dos biofilmes. Alguns autores consideram que as limitações difusionais à penetração do antifúngico através do biofilme, podem ser consideradas um mecanismo de resistência. A passagem do antifúngico através das diferentes camadas de células e da matriz polimérica faz com que a concentração que atinge as células mais internas do biofilme seja inferior (Donlan & Costerton 2002, Mah *et al.*, 2004).

Os estudos sobre o impedimento da adesão e conseqüentemente o desenvolvimento e amadurecimento do biofilme necessitam ser ainda intensificados,

visando uma maior compreensão dos mecanismos celulares, moleculares e de resistência envolvidos no processo.

A análise da composição química do óleo essencial de *C. sativum* através da avaliação realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) mostrou que este apresenta como compostos majoritários, substâncias voláteis derivadas de álcoois e aldeídos, como deceno, decanal, decenol, decenal, decanol, dodecanal, dodecanol, tetradecenal, tetradecanol, tridecanol, hexenol, ciclodecano. A fração F<sub>8-10</sub>, de melhor atividade, mostrou-se enriquecida em 3-hexen-1-ol (16,08%), 2-hexen-1-ol (14,52%) e ciclodecano (44,16%) (Figura 17, Tabela 16). A atividade anti-*C. albicans* desses compostos majoritários presentes na fração F<sub>8-10</sub> foi confirmada através de testes com compostos padrões (Sigma-Aldrich®) frente à cepa CBS 562 e ao isolado clínico 13A5. Os microrganismos foram escolhidos pelo fato de estarem entre os mais prevalentes na cavidade bucal. Os dados estão apresentados na Tabela 17.

Analisando os resultados da MIC obtidos para os compostos padrões (Sigma-Aldrich®) observou-se que todos apresentaram forte atividade de inibição contra *C. albicans* (MIC até 0,5 mg/mL). Em relação a *C. albicans* CBS 562, o óleo bruto de *C. sativum* apresentou um valor de MIC inferior aos compostos ativos padrões (Sigma-Aldrich®), demonstrando, dessa maneira, que o crescimento fúngico foi melhor controlado pelo óleo essencial bruto do que pelos compostos padrões isoladamente. Em relação ao isolado clínico 13A5 notamos que o óleo essencial bruto de *C. sativum* apresentou capacidade de inibição equivalente a do composto 3 trans hexen-1-ol (ambos com MIC 0,031mg/mL), inibição superior a dos compostos 2 cis- hexen-1-ol (MIC 0,063mg/mL) e 3 cis- hexen-1-ol (MIC 0,125 mg/mL) e finalmente inibição inferior a dos compostos 2 trans hexen- 1 –ol( MIC 0,007 mg/mL) e ciclodecano (MIC 0,015 mg/mL).

Comparando-se a ação inibitória da Fração F<sub>8-10</sub> (MIC 0,015 mg/mL) de *C. sativum* aos compostos ativos padrões (Sigma-Aldrich®), observa-se que a fração F<sub>8-10</sub> apresentou valores de MIC inferiores para a cepa CBS 562 e, portanto, uma capacidade de inibição superior. Em relação ao isolado clínico 13A5 verificamos que a Fração F<sub>8-10</sub> de *C. sativum* se mostrou mais eficaz que todos os compostos padrões (Sigma-Aldrich®) exceto para o 2 cis hexen-1-ol e 3 cis hexen-1-ol (Tabela 17).

A mistura de todos os compostos ativos padrões (Sigma-Aldrich®) presentes na fração F<sub>8-10</sub> de *C. sativum* foi feita levando-se em conta as proporções relativas encontradas no óleo bruto através da análise por cromatografia gasosa. A mistura se

apresentou mais eficaz na inibição do crescimento das leveduras do que o óleo bruto e do que a própria fração F<sub>8-10</sub>, com valor de MIC de 0,0005mg/mL. Nota-se dessa maneira que houve sinergismo entre os compostos presentes na mistura.

Segundo Kim *et al.* (2008), óleos essenciais de *C. sativum*, *Liquidambar orientalis* e *Valeriana wallichii* são constituídos de compostos voláteis ricos em alcoóis, aldeídos, terpenóides, e fenóis. Os mesmos apresentam conjuntamente ou independentemente propriedades biológicas antifúngicas, inseticidas e nematicidas.

Delaquis *et al.* (2002), demonstraram que os óleos essenciais das sementes e folhas de *C. sativum* foram efetivos contra *Pseudomonas fragi*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. cerevisiae* e principalmente contra *Listeria monocytogenes*, provavelmente pela presença de uma longa cadeia carbônica (C6 – C10), e compostos voláteis derivados de álcoois e aldeídos, identificados como linalol, octanol, 1 – decanol, (Z) – 3 – hexen – 1 - ol, (E) – 2 – decen – 1 – ol, decanal e (E) – 2 – decenal, respectivamente. Também foi identificada a presença de terpenos em grande abundância nos óleos essenciais de *C. sativum*, *E. dives* e *A. graveolens*. O composto encontrado em maior concentração foi o linalol (25,6%) e as frações obtidas a partir do óleo essencial das sementes mostraram-se muito mais potentes que o próprio óleo bruto. A fração 1 mostrou ser uma mistura de alfa-pineno (89,4%) e camphona (8,50%), que inibiu fortemente os microrganismos, particularmente a levedura. Inicialmente, os autores relacionaram a forte atividade antimicrobiana a compostos fenólicos presentes nas plantas, porém ao verificarem que várias frações eram deficientes nesses compostos, concluíram que a forte atividade foi promovida pelas outras substâncias presentes no óleo essencial.

Esses dados, quando analisados em conjunto, demonstram que os componentes químicos presentes na planta variam em relação à parte testada, maturidade da planta, variedade da mesma, região geográfica a qual a mesma foi cultivada e condições diversas de processamento. Isso pode gerar compostos quantitativamente e qualitativamente diferentes (Xu *et al.*, 2003; Pino *et al.*, 2002).

Em resumo, o sinergismo das moléculas presentes em frações de óleos essenciais revela a maior eficácia das mesmas, visto que as moléculas reunidas potencializam a ação das substâncias ativas presentes nessa mistura. Isso mostra que esses compostos podem vir a constituir um fitofármaco com boa atividade antifúngica, o

que é muito procurado pelas indústrias farmacêuticas que visam um produto final a base de plantas medicinais de grande eficiência.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizada para detecção de possíveis alterações morfológicas das leveduras ocasionadas pela drogas convencionais (fluconazol e nistatina) e pelo óleo e fração  $F_{8-10}$  de *C. sativum* demonstrou que a estrutura celular de todas as espécies sem adição de drogas, se apresentou íntegra (Figuras 18a-19a-21a-21a-22a), isto é, sem alterações morfológicas.

A adição do fluconazol, da nistatina, do óleo essencial de *C. sativum* e da Fração  $F_{8-10}$  (essa somente em *C. albicans* por ser a mais prevalente na cavidade oral) demonstrou que as paredes celulares se modificaram, apresentando-se lesadas, murchas e com presença de pseudohifas disformes quando comparadas às estruturas íntegras (Figuras 18b-18g; 19b-19f; 20b-20f; 21b-21f e 22b-22f).

Esses resultados mostram que, de maneira geral, as drogas promoveram uma desestruturação na forma da parede celular das células leveduriformes de *Candida* spp. Nota-se ainda, que quando as drogas foram adicionadas as leveduras deixaram de se apresentar na sua forma leveduriforme e adquiriram a forma vegetativa (pseudohifas). Essa transformação é conhecida como polimorfismo e, geralmente ocorre quando as espécies de *Candida* encontram um ambiente inóspito para sobreviverem. Sendo assim, podemos considerá-lo como um mecanismo de resistência desenvolvido pelas mesmas quando são agredidas. Isso demonstra que ao adicionarmos a nistatina, o fluconazol, o óleo essencial bruto de *C. sativum* e a fração  $F_{8-10}$  ocorre uma resposta das leveduras à presença dos mesmos, determinando a susceptibilidade do biofilme dessas espécies de leveduras frente às drogas vegetais e sintéticas testadas.

Sidrim & Moreira (1999) e Mota & Nóbrega (2005) demonstraram experimentalmente que o polimorfismo total da espécie de *C. albicans* ocorreu apenas em soro fetal bovino puro incubado a 37 °C. Nesta condição não houve a ocorrência de células leveduriformes e sim uma alta semelhança com a forma micelial. Em outras condições contendo soro fetal bovino foram observadas tanto a forma filamentosa como a leveduriforme. Concluíram que os principais fatores de virulência e patogenicidade conhecidos até o momento são a grande capacidade de aderência aos diversos tipos de tecidos, conferida pelas adesinas, produção de hifas e pseudo-hifas que auxiliam na invasão do tecido, produção de toxinas e enzimas. Dessa forma, determinar quais substratos induzem a formação de pseudo-hifas e hifas verdadeiras nesse patógeno é de

fundamental importância para se compreender o processo infeccioso e assim, dar subsídios para o desenvolvimento de possíveis profilaxias e tratamentos para as infecções causadas pela *C. albicans* (Colombo & Guimarães, 2003).

Pode-se considerar ainda, que os eventos de diferenciação celular são induzidos pelas mudanças na expressão de genes que codificam fatores específicos, muitos dos quais são necessários para a virulência do microrganismo (Whiteway & Oberholzer, 2004). A via de transdução de sinal pertencente à família de proteínas Ras – proteína cinase A (PKA) é importante no processo de regulação e diferenciação tanto para a formação de hifas quanto para a virulência de *C. albicans* durante o desenvolvimento da infecção (Lo *et al.*, 1997).

Chandra *et al.* (2001) demonstraram em seu trabalho através de MIC e MEV que o aumento da resistência de *C. albicans* aos antifúngicos testados ocorreu simultaneamente ao aumento da atividade metabólica e reforça que a resistência não ocorre simplesmente como reflexo da atividade metabólica aumentada, mas coincide com a maturação do biofilme desenvolvida ao longo do tempo. Isso pode ser verificado através da MEV com um aumento da massa formadora do biofilme através da distribuição das células das leveduras e da maior formação de matriz extracelular.

Mohammed *et al.* (2006) em pesquisa similar com biofilmes e resistência microbiana mostrou utilizando MEV que o biofilme formado por *C. albicans* incubadas estaticamente e sob agitação sobre discos de catéteres, consistiu de uma densa rede de leveduras, tubos germinativos, hifas e pseudohifas. Em contraste com *C. albicans*, *C. tropicalis* sintetizou biofilmes com grandes quantidades de material extracelular e muitas das células foram quase totalmente envolvidas pela matriz. Através da MEV observou-se que os biofilmes de ambas as espécies de levedura apresentaram-se resistentes a anfotericina B e que o desenvolvimento do biofilme foi similar ao controle sem adição de drogas.

Em resumo, as espécies de *Candida* exibem a capacidade de crescimento tanto na forma de levedura como de micélio (tubo germinativo) em resposta aos diferentes fatores ambientais que possam estar agredindo ou atrapalhando o desenvolvimento da espécie. Isso demonstra que para a mesma sobreviver precisa lançar mão de recursos para sua sobrevivência enquanto espécie e, portanto, passa a expressar a sua forma mais resistente. Essa transição de levedura para micélio deve estar relacionada com a

patogenicidade deste microrganismo, passando, então, a ser considerada como um importante fator de virulência (Cutler, 1991).

A natureza produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, é o reino vegetal que contribui 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 contra condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também as condições de adaptação e regulação (Reinbothe *et al.*, 1990).

Com o intuito de se buscar novas fontes de medicamentos no reino vegetal, e para tanto, utilizando-se de técnicas quantitativa como MIC e qualitativa como MEV, verificou-se no presente trabalho que os óleos essenciais e os extratos vegetais testados, apresentaram de moderada a forte atividade contra células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp., com maior ênfase ao óleo essencial de *C. sativum* e suas frações, cuja atividade antimicrobiana foi superior entre as plantas medicinais estudadas.

Buscando-se ampliar o conhecimento sobre o uso de plantas como agentes antimicrobianos, estudos complementares de biodisponibilidade e de toxicidade seletiva necessitam ser realizados para que as substâncias ativas presentes em óleos e extratos vegetais possam vir a ser utilizadas em agentes antifúngicos garantindo segurança e eficácia. Nesse sentido o problema advindo da resistência antimicrobiana pode ser atenuado e, além disso, 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.

Pesquisas futuras deverão levar em conta esses fatores múltiplos e complexos, cujos conhecimentos adquiridos poderão viabilizar o emprego de recursos naturais no tratamento de diversas patologias, no mesmo patamar que as substâncias normalmente empregadas na medicina convencional.

Os dados obtidos na presente pesquisa, permitem concluir que:

- 1- De todas as plantas medicinais avaliadas, o óleo essencial de *C. sativum* é a melhor substância vegetal testada inibindo todas as amostras de *Candida* spp. com capacidade de inibição antifúngica considerada forte (MIC de até 0,5mg/mL).
- 2- A fração de melhor atividade antifúngica isolada do óleo de *C. sativum* é a do agrupamento F<sub>8-10</sub>. Os compostos ativos dessa fração apresentam forte atividade inibitória contra a espécie de *C. albicans* (MIC de até 0,5mg/mL). A mistura de todos os seus componentes ativos é a mais eficaz na inibição do crescimento das leveduras testadas. Notamos dessa maneira que a eficácia da Fração 8-10 do óleo essencial de *C. sativum* está presente no sinergismo existente entre as moléculas.
- 3- Substâncias voláteis derivadas de álcoois e aldeídos como: 3-hexen-1ol; 2-hexen-1 ol e ciclodecano estão presentes na F<sub>8-10</sub> de *C. sativum*, reconhecidas pela ação antimicrobiana contra os biofilmes e as células planctônicas de *Candida* spp.
- 4- Os antifúngicos convencionais (fluconazol e nistatina), assim como o óleo essencial e a fração F<sub>8-10</sub> de *C. sativum* inibem as células planctônicas (pré-adesão) de *Candida* spp. impedindo-as de se agregarem ao biofilme. A reaplicação do óleo essencial de *C. sativum* e nistatina promove um desarranjo na estrutura do biofilme.
- 5- Tanto o óleo essencial de *C. sativum*, a fração F<sub>8-10</sub>, assim como as drogas convencionais fluconazol e nistatina, promovem uma desestruturação na morfologia celular das espécies de *Candida*, detectando-se a presença de polimorfismo entre as células leveduriformes.

**REFERÊNCIAS\***

Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J Agric Food Chem*. 1998; 46: 1739 - 45.

Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou I B. Composition and antimicrobial activity of essential oil of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*. 2001; 40: 4168 -70.

Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, Poster SR. Characterization of *Candida* spp. Isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 44-9.

Amorozo, MCM. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, LC. *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: UNESP. 47-68, 1996.

Arendorf TM & Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol*.1980; 25: 1-10.

Arikan A, Kulak Y, Kadir T. Comparison of different treatment methods for localized and generalized simple denture stomatitis. *J Oral Rehabil*. 1995; 22(5):365-9.

Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, *et al*. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:3591–6.

Bagg J, Silverwood RW. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. *J Med Microbiol*.1986; 22: 165-9.

Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J.Med.Microbiol*. 2003; 48: 671-9.

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

Baillie GS, Douglas LJ. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol*. 1999; 310:644–56.

Baillie GS, Douglas LJ. Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. *Antimicrob Agents and Chemother*.1998; 42 (8): 1900-05.

Baillie GS, Douglas J. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrob Agents and Chemother*.1998; 42 (8): 2146-9.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Bakkali, F, Averbeck S, Averbeck D, Zhiri A, Idaomar M. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research. 2005; 585: 1–13.
- Barchiesi F, Hollis RJ, Del Poeta M, McGough DA, Scalise G, Rinaldi MG, *et al.* Transmisión of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and oropharyngeal candidiasis documented by pulsed-field gel electrophoresis. Clin Infect Dis. 1995; 21: 561-64.
- Barturen B, Bikandi J, San Millan R, Moragues RD. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. Microbiol. 1995; 141 (7): 1535-43.
- Baselga R, Albizu I, Amorena B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. Vet Microbiol. 1994; 39(3-4): 195-204.
- Biasoli MS, Tosello ME, Magaro HM. Adherence of *Candida* strains isolated from gastrointestinal tract. Mycoses. 1999; 45: 465-69.
- Blumenthal M. Herb sales down 15 percent in mainstream market. Herbalgram. 2001; 51: 69
- Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Herbal medicine - Expanded Commission E monographs. Austin: Am Botan Council, 2000.
- Boniotto M, Hazbón MH, Jordan WJ, Lennon GP, Eskdale J, Alland D, *et al.* Novel hairpin-shaped primer assay to study the association of the 44 single-nucleotide polymorphism of the DEFB1 gene with early-onset periodontal disease. Clin. Diagn. Lab Immunol. 2004; 11: 766-9.
- Borg M. & Rüchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. Infect Immun. 1988 ; 56: 626-31.
- Bouchara J P, Tronchin G, Annaix Robert VR, Senet JM. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. Infect Immun. 1990; 58(1): 48-54.
- Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 1994; 60 (7): 2355-9.
- Branting C, Sund ML, Linder LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. Arch Oral Biol. 1989; 34(5): 347-53.
- Brawner DL, Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol. 1989; 27(6): 1335-41.
- Bremness L. Plantas Aromáticas – Guia Prático. Círculo de Leitores, Lisboa, 1993.
- Bremness L. O Grande Livro das Plantas Úteis. Editorial Verbo, Lisboa, 1989.

- Buckel J. Literature review: should nursing take aromatherapy more seriously? *Br J Nurs*. 2007;16(2):116-20.
- Buffo J, Herman MA, Soll D R. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathol*.1984; 85: 21-30.
- Cabib E, Roh DH, Schmidt M, Crotti LB, Varma A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem*. 2001; 276(23):19679-82.
- Calderone RA. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch Med Res*. 1993; 24: 275-79.
- Calderone RA & Braun P C. Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 1991; 55(1): 1-20.
- Calderone RA & Scheld WM. Role of fibronectin in the pathogenesis of candidal infections. *Rev Infect Dis, Suppl*. 1987; 4:400-3.
- Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33 (5): 437-42.
- Candido RC, Azevedo RVP, Ito II. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. *Rev Odontol Unacid*. 1995; 7: 27-33.
- Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res*. 1995; 74(5): 1152-61.
- Cao YY, Dai B, Wang Y, Huang S, Xu YG, Y BCao, *et al*. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *International J Antimicrob Agents*. 2008; 32:73–7.
- Cao YY, Cao Y B, Xu Z. cDNA microarray análisis of differential gene expresión in *Candida albicans* biofilm exponeo to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 584-89.
- Cardoso BC. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* [dissertação]. Portugal: Universidade do Minho; 2004.
- Carlsson J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1):75-80,
- Casadevall A & Pirofski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis*. 2001; 184: 337-44.
- Casanova M, Cervera AM, Gozalbo D, Martínez JP. Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1997 ; 65: 4360-64.
- Cassone A, De Bernadis F, Torosantucci A. *et al*. In Vitro and in vivo anticandidal activity of Human Immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis*. 1999; 180(2): 448-53.

- Castilho RO, Alvino CS, Kaplan MAC. Atividade antifúngica e investigação química de *Licania tomentosa* Benth, In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002 nov 19-22; Cuiabá. p. 053.
- Cecanho R, Koo H, Rosalen PLJA, Park YK, Cury JA. Efeito do extrato hidroetanólico de *Mikania laevigata* sobre o crescimento bacteriano e a produção de glucanos por estreptococcus do grupo *mutans*, In : Anais da XIV Reunião Anual da FESBE (Federação da Sociedade de Biologia Experimental); 1999. aug 25-28; Caxambu.v.14, p.290.
- Cecanho R, Koo H, Rosalen PLJA, Pierobon CN, Park YK, Rehder VLG, Foglio MA, Queiroga CL. Atividades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais sobre patógenos bucais”. In : Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1998 oct 14 -17; Águas de Lindóia.
- Cechinel Filho V, Nunes RJ, Morais VMF, Gomes STA, Queiroz E, Lima EO, Yunes RA. Atividade antifúngica de análogos da filantimida, In: Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1994 set 20 – 23; Fortaleza.p. 123.
- Centeno A, Davis CP, Cohen MS, Warren MM. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. Infect Immun. 1983 ; 39(3):1354-60.
- Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M. Gozalbo D and Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression.Microbiol Mol Biol Rev.1998; 62(1): 130-80.
- Chandra J. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. J Dent.Res. 2003; 80 903-8.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee P K, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *candida albicans*: development, architecture and drug resistance. J Bacteriol.2001;183 (18): 5385-94.
- Chen Y. Method of treating *Candida* and *Cryptococcus* fungal infections by administering gentian, U.S. Patent US 5837254 A, 1996.
- CLSI. Clinical and Laboratorial Standards Institute, norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2002; 22(15), 2ª. ed.
- Cochrane DM, Brown MR, Anwar H, Weller PH, Lam K, Costerton JW. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. J Med Microbiol. 1988; 27(4): 255-61.
- Colombo AI & Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36 (5): 599-607.

- Constantin MB, Sartorelli P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJP, *et al.* Emerenciano VP. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. *Planta Med.* 2001; 63: 771-3.
- Cortez DAG, Cortez LER. Compostos antifúngicos de *Kielmeyera coriacea*, In: Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1998 oct 14 -17; Águas de Lindóia p.115. 1998.
- Costa JBP, Maranhão CA, Santos JC, Silva LLD, Nascimento MS. Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico das raízes de *Cordia nodosa*; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002a nov 19 - 22 ; Cuiabá, p. 150.
- Costa JBP, Santos DMS, Silvério ML, Santos JC, Calazans GT, Nascimento MS. Avaliação da atividade antimicrobiana das raízes e folhas de *Mascagnia rígida* (Juss.) Griseb; In : Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002b nov 19 – 22; Cuiabá.p. 149.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318-22.
- Cunha GMA, Viana GSB, Rao VSN, Mafezoli J, Oliveira MCF, Lima MAS, Silveira ER. Atividade antimicrobiana de oleos essenciais de espécies de *Croton* e *Psidium*; In: Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil,1994 sept 20 – 23 september; Fortaleza.p. 218.
- Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans* *Annu Rev Microbiol.*1991; 45:187-218.
- Dahlen G. Microbiological diagnostics in oral diseases. *Acta Odontol Scand.* 2006; 64(3):164-8.
- Davey ME & O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 847-67.
- Davis, P. Aromaterapia. São Paulo: Ed. Martins Fontes;1996.
- De Smet PAGM, Bonnel G, Van Der KuyA, Hekster YA, Pronk MH, Brorens MJA, *et al.* Introduction to the pharmacoconomics of herbal medicines. *Pharmacoconomics.* 2000;18(1):1-7.
- Delaquis PJ; Stanich K; Girard B; Mazza G; Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Inte J Food Microbiol.* 2002; 74: 101.
- Depkevicius A, Venskutonis R, Beek TAV, Linssen J. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.*1998; 77:140-6.

- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999; 65:337–53.
- Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA, Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Microbiol.* 2002; 2950–8.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9):881-90.
- Donlan RM & Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-93.
- Dougherty SH. Pathobiology of infection in prosthetic devices. *Rev Infect Dis.* 1988;10: 1102-17.
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol.* 2004; 11 (1): 30-36.
- Douglas L J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *Crit Rev Microbiol.* 1987; 15 (1):27-43.
- Drago L, De Vecchi E, Fassina MC, Mambelli B, Gismondo MR. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor. *International J Antimicrob Agents.* 2000; 16 (4):545-47.
- Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL, *et al.* E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV- infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15: 446- 55.
- Duarte MCT, Figueira GM. Anti- *Candida* activity of extracts and essential oils from native and exotic medicinal plants in Brazil. In Maria Cecilia Carpinella, Mahendra Rai (Org). *Novel Therapeutic Agentes from Plants.* 1st ed. New Hampshire: Science Publishers, 2008.
- Duarte MCT, *Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil.* Multiciência, 2006.
- Duarte MCT, Figueira, GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97: 305-11.
- Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de espécies da coleção de plantas medicinais do CPQBA/UNICAMP; In: *Anais do Congresso Ibero-Americano de Plantas Medicinais;* 2004a; Angra dos Reis.p.59
- Duarte MCT, Leme EE, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG. Effects of essential oils from medicinal plants used in brazilian folk medicine against EPEC and ETEC *Escherichia coli*; In: *Anais of III Int. Symp. Breeding Res. on Medicinal and Aromatic Plants;* 2004b Campinas.p. A08-15.

- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C, Levada CA. Atividade e composição química do óleo essencial de plantas medicinais usadas no Brasil contra *Candida albicans*; In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2003a. Florianópolis p.011.
- Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C, Levada CA. Composição química e avaliação do óleo essencial de espécies do gênero *Cymbopogon* spp para atividade antimicrobiana; In: Anais do II Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2003b. Campinas.p. 33.
- Dulger B & Gonuz A. Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Salvia* and *Stachys* species. *Pharmacol Biol.* 2004; 42: 301-4.
- El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(5):1067-73.
- Fau D, Lekehal M, Farrell G, Moreau A, Feldmann G, Haouzi D, Pessayre D. Diterpenoids from germander, an herbal medicine, induce apoptosis in isolated rat hepatocytes *Gastroenterol.* 1997; 113: 1334.- 46.
- Fernanado PHP, Panagoda GJ & Samaranyake LP. The relation between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS.* 1999; 107:1034-42.
- Ferreira EC, Rodrigues AB, Ferreira HD, Ferri PH, Silva MRR. Atividade antifúngica in vitro de *Annona* e *Solanum* em espécies de *Candida* isoladas de pacientes com AIDS, In: Anais do XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil; 1998 oct 14-17 october; Águas de Lindóia. p. 03.053.
- Figueira GM, Duarte MCT, Silva CAL, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Pipe* spp. cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp; In Anais do 43º Congresso Brasileiro de Olericultura; 2003a. Recife.
- Figueira GM, Pereira B, Duarte MCT, Delarmelina C, Levada CA. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de espécies da coleção de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA/Unicamp”; In Anais do II Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais; 2003b. Campinas. p. 34.
- Flach A, Linhares CE, Alves SH, Silva UF, Simionato E, Morel AF. Atividade antifúngica de *Calea serrata* LESS (Asteraceae); In: Anais do XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil; 2000 oct 17 - 20 october; Recife.p. 274.
- Foglio MA, Denny C, Rodrigues RAF, Antonio MA, Kohn LK, Carvalho JE, Silva AP, Sousa I MO, Delarmelina C, Duarte MCT. Atividade antiproliferativa e antimicrobiana do óleo essencial de *Virola sebifera* e *Cayaponia espelina*; In: Anais do II Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais; 2003. Campinas. p. 45.

- Foglio MA, Rodrigues RAF, Sousa IMO, De La Nuez FC, Silvestre MAC, Delarmelina C, Machado ALM, Duarte MCT. Atividade antimicrobiana e concentração mínima inibitória de lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Artemisia annua* L; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002. Cuiabá.
- Furletti VFF, Mardegan RC, Anibal PC, Obando Pereda G, Duarte MCT, Hofling JF, Susceptibility of *Candida* spp. Oral Isolates for Azolic Antifungals and Amphotericin B. Brazilian J Oral Sciences. 2008; 7(25):1543-9.
- Galli A, Franzetti L, Briguglio D. Attività antimicrobica in vitro di oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. Industrie alimentari, 1985;463-6.
- Ghannoum M & Abu-Elteen K. Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses.1990; 33(6): 265-82.
- Gilbert P, Maira-Litran T, Mcbain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. Adv Microb Physiol. 2002;46: 203-56.
- Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiol.1998;144 (4):829-38.
- Giveon SM, Liberman N, Klang S, Kahan E. Are people WHO use “natural drugs” aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? Patient Educ. Couns.2004; 53: 5-11.
- Glee PM & Hazen KC. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins. J Med Vet Mycol. 1995; 33:117–22.
- Guarro J. Comments on recent human infections caused by *ascomyces* Med Mycol. 1998; 36(5): 349-50.
- Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discov Today.2000; 5(7):294-300.
- Hasenclever HF, Mitchell WO. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J Bacteriol.1961; 82: 570-3.
- Hazen KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infect Immun.1989; 57(5):1894- 1900.
- Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci. 2001; 25:14637- 42.
- Hoene FC. Plantas e substância vegetais tóxicas e medicinais. Graphicars: São Paulo, 1939.

- Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol*. 2004; (5): 1212-23.
- Hogan DA, Kolter R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*. 2002; 296(5576): 2229-32.
- Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun*. 1995a; 63(5):1827-34.
- Holmes R, Cannon D. and Jenkinson F. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J Industr Microbiol*. 1995b; 15: 208–13.
- Hube B. Extracellular Proteases of Human Pathogenic Fungi. *Contrib Microbiol, Basel, Karger*. 2000; 5:126-37.
- Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol*. 1996; 7(1):55-69.
- Ito K, Yumi C, Paiva CA; Loberto, JCS Santos, Cardoso JAO. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and control patients. *Pesqui Odontol Bras*. 2004; 18(1): 80-4.
- Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *Microbiol Lett*. 2004; 236(2):163-73.
- Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem*. 1985; 33(2): 213-17.
- Kam AP, Xu J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diag Microbiol and Infect Dis*. 2002; 43: 19-28.
- Kaminishi H, Mihashi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, *et al*. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* protease. *Infect Immun*. 1995; 63(3):984-8.
- Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potencial. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56:285-9.
- Kim J , Seo SM, Lee SG, Shin SC, Park K. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum Liquidambar orientalis), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) *J. Agric. Food Chem*. 2008; 56 (16): 7316-20.
- Kingston DGI. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: Wermuth, C. (ed.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 1996; 101-14.
- Kirkpatrick R, Lopez-Ribot L, Mcatee K. and Patterson F. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J Clin Microbiol*. 2000 ;38: 902–04.

- Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; 50:97–101.
- Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, Sanglard D, Merker R, Schröder M, *et al.* Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonites. *Infect Immun.* 1999; 67 (12):6637-42.
- Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1773–80.
- Kunamoto CA. *Candida* Biofilms. *Current Opinion in Microbiol.* 2002; 5: 608-11.
- Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D and Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(6): 349-53.
- Kutsyk RV, Pavliuk TD. Investigation of quantitative and species composition and antifungal drug susceptibility of yeasts isolated from patients with generalized periodontitis complicated by candidosis. *Microbiol.* 2003; 65(5):26-29.
- Lamster, IB, Grbic JT, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchell A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 62-75.
- Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences.* 2003; 73:167–79.
- Lemos TLG, Bandeira PN, Pessoa ODL, Sousa MUD, Nogueira NAP. Atividade antimicrobiana versus composição química dos óleos essenciais da resina e Lima EO, Gomes STA, Oliveira NMC, Morais VMF, Paulo, MQ, Carvalho NLB, Araújo VC. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras do gênero *Cândida*; In: Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002 sept 20 – 23 september; Fortaleza. p. 34.
- Lentz DL, Clark AM, Hufford CD, Meurer-Grimes B, Passreiter CM, Cordero J, Ibrahimi O, Okunade AL. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants, *J Ethnopharmacol.* 1998; 63: 253-63.
- Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad II, Prince R A. Antifungal Activity of Amphotericin B, Fluconazole, and Voriconazole in an *In Vitro* Model of *Candida* Catheter-Related Bloodstream Infection. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 2002; 46 (11): 3499-3505.
- Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol.* 2003; 49:353–62.
- Lima EO, Freire KRL, Farias NMP. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Punica granatum* L. (Punicaceae), *Infarma.* 2002; 14: 46-9.

- Lima EO, Morais VMF, Savi AOS, Cruz AB, Cechinel Filho V, Ciccio JF. Constituintes químicos e potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae); In: Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1996 sept 17 – 20; Florianópolis.p.15.
- Lima EO, Morais VMF, Gomes STA, Cechinel Filho V, Miguel OG, Yunes RA. Efeito antifúngico da xantoxilina; In: Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1994 sept 20 – 23 september; Fortaleza.p.122.
- Lo Cantore P, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, and Senatore F. Antibacterial Activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) Essential Oils. J Agrig Food Chem. 2004; 52(26): 7862 – 66.
- Lo HJ, Kohler JR, Didomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C.albicans* mutants are avirulent. Cell. 1997; 90: 939-49.
- Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J. Bacteriol. 2000; 182(5):1374-82,
- Lopez-Ribot JL, Casanova M, Martinez JP, Sentandreu R. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. Infect Immun. 1991; 59(7): 2324-32.
- Macdonald F & Odds FC. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. J Med Microbiol.1980; 13:423-35.
- Magaldi S. In Vitro susceptibility of 137 *Candida* spp. isolates from, HIV patients to several antifungal drugs. Micopathol. 2001; 149:63-8.
- Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2004;(9): 34-9.
- Mahady GB. Global Harmonization of Herbal Health Claims. J Nutr. 2001.131: 1120S-1123S.
- Mandeel Q & Taha A. Assessment of in vitro antifungal activities of various extracts of indigenous Bahraini medicinal plants. Pharmaceut Biol. 2005; 43: 164-72.
- Marques RWC & Caixeta JV. Seasonality of the flowers and ornamental plants market in São Paulo state - the case of CEAGESP-SP<sup>1</sup> Rev. Econ. Sociol. 2002;40(4).
- Marra A & Camargo LFA. Fluconazol ou Anfotericina B no Tratamento de Candidemias em pacientes internados na UTI. Rev Assoc Med Bras. 2002; 48(2): 93-117.
- Martínez MJ, Betancourt J, Alonso-González N, Jauregui A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, J Ethnopharmacol. 1996; 52(3): 171-4.
- Martins ER, De Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995.

- Mauro C, Cardoso CMZ, Schultze C, Yamamichi E, Lopes PS, Marcondes EMC, Miranda JP, Arruda DAO, Frota M, Pacheco AL. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Rubus rosaefolius* Sm. – Rosaceae; In : Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2000 oct 17 – 20; Recife.p.90.
- McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochem.*2007; 68: 2015-22.
- Melo EA, Mancini JF, Guerra NB. Atividade Antioxidante de extratos de Coentro (*Coriandrum Sativum* L). *Cienc Tecnol Aliment.* 2003; 23:195-9.
- Melo VMM, Souza RC, Andrade Neto M, Silveira ER. Atividade antimicrobiana de 2-tridecanona extraída de *Pilocarpus trachyllophus*; In: Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1994 sept 20 – 23; Fortaleza.p.34.
- Menezes E A, Augusto KL, Freire CCF, Cunha FA, Montenegro RM. Montenegro Junior R.M. Frequência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(4): 241- 44.
- Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T and Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol.*1994; 32: 1115-8.
- Mohammed A, Al-Fattani, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.*2006; 55: 999–1008
- Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, *et al.* *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internatl Microbiol.* 1998; 1: 95-106.
- Morais JPS, Braga CJM, Carneiro-Loureiro A, Albuquerque AAC, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH, Nogueira NAP. Efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Benth e seus principais constituintes terpineol e cineol; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002 nov 19 – 22; Cuiabá. p. 345.
- Moreira JN, Birman EG, Cury AM. Suscentibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev Odont.* 1999; 13(4):343-48.
- Mota AJ & Nóbrega FG. Indução do pleomorfismo de *Candida albicans* por soro fetal bovino. In: Anais do IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica. 2005.
- Muñoz AJC, Abarca L, Quindós GP. Resistencia *in vitro* al Fluconazol e Itraconazol en aislamientos clinicos de *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol.*1997; 14:50-4.
- Murphy AR & Kavanagh KA. Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. *Med Mycol.* 2001; 39:123-7.

- Nakamura CV, Bando E, Nakamura TU, Cortez DAG. Atividade antifúngica do óleo essencial extraído do *Ocimum gratissimum* L.; In: Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1996 sept 17 – 20. Florianópolis.
- Navarro V, Villarreal ML, Rojas G., Xavierb L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, J Ethnopharmacol.1996; 53(3): 143-7.
- Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. J Dentistry.1998; 26: 299-304.
- Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Makihira S, Samaranayake LP. Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation in vitro. Mycopathol. 1998; 144(3): 125-9.
- Nimrichter L, Rodrigues M L, Rodrigues EG, Travassos LR. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. Microb Infect. 2005;7:789-98.
- Nunes RS, Ferreira RQ, Rolim Neto PJ, Santana DP, Xavier HS, Ximenes EA. Atividade antiúngica da *Lippia sidoides* (CHAM); In: Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil;1998 oct 14 -17; Águas de Lindóia. p.46.
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1998.
- OMS - Organización Mundial de La Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005. Ginebra, 66, 2002a.
- OMS - Organización Mundial de La Salud. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra, 75, 2002b.
- OMS, Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.
- Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman T. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcinairin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. Antimicrob Agents and Chemother. 2003;47: 956-64.
- Paiva JC, Monteiro RM, Branco CCC, Fonseca SGC, Fonteles MMF. Avaliação antisséptica da *Myracrodruon urundeuva* Fr. All; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002 nov 19 – 22; Cuiabá. p. 290.
- Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. APMIS.1998;106(7):736-42.
- Paniagua CG, Monroy PE, Negrete AE, Vaca PS. Susceptibility to 5- Fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS patients.Rev Latinoam Microbiol. 2002; 44(2):65-8.

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, Edwards JE ,*et al.* Role of the fungal Rasprotein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol.* 2005 ;7(4):499-510.

Paula CR Candidíases. In: ZAITZ, C. *et al.* *Compêndio de micologia médica.* Rio de Janeiro: MEDSI: 99-107, 1998.

Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martinez M, *et al.* Prevalence of molecular mechanisms os resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001,45: 2676-84.

Persons DA, Laughlin M, Tanner D, Perfect J, Gockerman JP, Hathorn JW. Fluconazole and *Candida krusei* fungemia. *N Engl J Med.* 1991;325:1351.

Peterson DE, Minah GE, Overholser CD, Suzuki JB, DePaola LG, Stansbury DM, *et al.* Microbiology of acute periodontal infection in myelosuppressed cancer patients. *J Clin Oncol.*1987; 5: 1461-8.

Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect.*1995,30 (Suppl): 329-38.

Pires MFC, Birman, Esther G; Riera CC; Gambale W; Paula CR. *Candida albicans* byotipes isolated from the oral cavity of HIV-positive patients. *Rev Microbiol.*1996; 27(1): 46-51.

Pizzo G, Giuliana G, Milici ME. Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. *New Microbiol.* 2000; 2(1):63-71.

Plummer N. New antimicrobial compositions which colonise the small intestine – contain non-pathogenic microorganisms and *Allium* plant material; for treating gastrointestinal and urogenital disease. U.S. Patent EP554319-A. 1992.

Proença A. Plantas Aromáticas em Portugal – Caracterização e Utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian, Serviço de Educação e Bolsas, Lisboa, 2007.

- Queiroz MVF, Lima EO, Santos RC, Mendonça VBA. Estudo das propriedades antifúngicas de plantas medicinais sobre leveduras isoladas de pacientes com candidose bucal; In: Anais do XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil; 2000 oct 17 – 20; Recife.p. 263.
- Qureshi M N, Barr C E, Seshamma T, Reidy J, Pomerantz RJ, Bagasra O. Infection of oral mucosal cells by human immunodeficiency virus type 1 in seropositive persons. J Infect Dis.1995;171:190-93.
- Ramage G., Walle KV, Wickes BL and López-Ribot JL. Standardized Method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001a; 45 (9): 2475-79.
- Ramage G, Walle KV and López-Ribot JL Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol.2001b; 39 (9): 3234-40.
- Ray TL & Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infect Immun. 1990; 58(2): 508-14.
- Rayhan R, Xu L, Santarpia RP. Antifungal activities of salivary histidine-rich polypeptides against *Candida albicans* and other oral yeast isolates.Oral Microbiol Immunol.1992;7:51-2.
- Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Duarte MCT, Figueira GM. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. Rev Bras Plantas Med.2004; 6(2): 67-71.
- Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Duarte MCT, Figueira GM. Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de duas espécies de *Origanum*; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil; 2002. Cuiabá.
- Reichart PA. Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections, Kaposi's sarcoma. Med Microbiol Immunol. 2003; 192: 165-9.
- Reinbothe S, Krauspe R, Parthier B. *In vitro*-transport of chloroplast proteins in a homologous Euglena system with particular reference to plastid leucyl-tRNA synthetase. Planta.1990; 181:176-83.
- Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(4): 729-59.
- Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. J Clin Periodontol. 2001; 28(9):860-4.
- Robinson PG. Periodontal diseases and HIV infection. J Clinical Periodontol. 1996; 609–14.

- Rodrigues RA, Queiroga CL, Foglio MA, Paiva ES, Helene G B, Delarmelina C, Duarte MCT. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Achyrocline satureoides* (Macela) E *Ocotea pretiosa* (sassafrás); In: Anais do II Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais; 2003; Campinas. p. 44.
- Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases, J Ethnopharmacol. 2001;74(1): 97-101.
- Rüchel R, De Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases. J Med Vet Mycol. 1992; 30(1):123-32.
- Salvador MJ, Souza CRF, Candido RC, Dias DA, Oliveira WP. Extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae): avaliação de parâmetros para o preparo e atividade antifúngica; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002 nov 19 – 22; Cuiabá. CQ. 007.
- Samaranayake LP, Nair RG. Oral *Candida* infections--a review. Indian J Dent Res. 1995; 6(3):69-825.
- Samaranayake LP. & Macfarlane TW. The effect of dietary carbohydrates on the in-vitro adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells. J Med Microbiol.1982; 15(4):511-7.
- Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN *et al.* Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. Am J Med. 1994; 97(4): 339-46.
- Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F Marcelo Ferreira MS , Alcântara A P, Carvalho MT, Colombo AL. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. Mem Inst Oswaldo Cruz.2002; 97(2): 253-57.
- Santos RC, Lima EO, Carvalho FFP, Paulo MQ, Queiroz VF. Candidíase relacionado ao uso de prótese dentária e ação de *Cymbopogon citratus* D.C. Staf (Capim Santo); In: Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002 oct 17 – 20;Recife.p. 245.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial acitivity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Br J Microbiol. 2004; 35:275-80.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas aromáticas contra *Candida albicans*; In: Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 2002a; Cuiabá.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Anticandidal activity of essential oils from some medicinal plants used in Brazil; In: Anais do XVI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (ALAM)2002b Cuba.

- Sato MEO, Martins JLS, Luz MMS. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato fluido de *Casearia sylvestris* Swartz ("Guaçatonga"); In: Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1996 sept 17 – 20; Florianópolis.p.170.
- Savi AOS, Cruz AB, Ciccio JF, Lima EO, Morais VMF, Cechinel Filho V. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Bursera simaruba* (Linneo) Sargent (Burseraceae); In: Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil; 1996 sept 17 – 20; Florianópolis.p.14.
- Schaller M, Korting HC Allergic airborne contact dermatitis from essential oils used in aromatherapy. Clin. Exp. Dermatol.1995; 20(2): 143-45.
- Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões C M O, Schenkel E P, Gosmann G, Mello JC P, Mentz, L A Petrovick PR (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. PortoAlegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Capítulo 15. 301- 332, 2001.
- Scott L. A review of plants used in the treatment of Liver Disease: Part-I ND - Alternative Medicine Review, 1998.
- Schultes RE & Reis SV. Ethnobotany: evolution of a discipline. Oregon: Dioscorides Press, 414, 1997.
- Schwab U, Milatovic D, Braveny I. Increasing adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from patients with AIDS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.1997;16(4):296-300.
- Secco RS. Produtos naturais: alternativa segura? / Natural products: secure alternative? Ciênc Cult.1990; 42(10/12): 807-10.
- Senet JM, Risk factors and physiopathology of candidiasis Rev Iberoam Micol.1997;14: 6-13.
- Shale TL, Stirk WA., van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity, J Ethnopharmacol. 1999; 67:347-54.
- Shao ZH, Vanden Hoek TL, Qin Y, Becker LB, Schumacker PT, Li CQ, et al. Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 282:999–1006.
- Shapiro JA. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu Rev Microbiol.1998; 52:81-104.
- Shu YZ. Recent natural products based drug development: Apharmaceutical industry perspective. J Natural Products.1998; 61:1053-71.
- Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1999.

- Silva KL & Cechinel Filho V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*. 2002; 25: 449-54.
- Silva MV, Costa TR, Ferreira EC, Fernandes OFL, Santos SC, Liao LM, Ferri PH, Paula JR, Ferreira HD, Silva MDR. Growth inhibition effect of Brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species, *Pharm. Biol.* 2001; 39:138-41.
- Simões JLP, ACF Amaral, EV Ferreira. Coletânea científica de plantas de uso medicinal - FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2005.
- Simões CM & Schenkel EP. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais : a necessária interação da indústria com a academia. *Rev Bras Farmacogn.* 2002; 12: 35-40.
- Simões MO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. orgs.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC: Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.
- Simonetti N, Strippoli V, Cassone A. Yeast-mycelial conversion induced by *N*-acetyl-*D*-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature*. 1974; 250:344- 46.
- Singleton DR, Masuoka J, Hazen KC. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol.*2001; 183:3582–8.
- Slots J, Rams, TE Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.*1988; 3: 47-52.
- Sohn HY, Son KH, Kwon CS, Kwon GS, Kang SS. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *M. mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.), *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine*. 2004; 11: 666-72.
- Stefanini MB, Figueiredo RO, Ming LC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de algumas espécies condimentares. *Hort Bras*. 2001; 19: 274.
- Sudbery P, Gow N, Dowd S. Antimicrobial peptides with therapeutic potencial. *T Microbiol.* 2004; 12:317-24.
- Suresh B , Sriram S, Dhanar SA, Elang K, Chinnaswamy K. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J Ethnopharmacol.* 1997; 55:151-9.
- Suresh B, Dhanasekaran S, Kumar R V, Balasubramanian S. Ethnopharmacological studies on the medicinal plants of Nilgiris Indian Drugs.1995; 340-52.
- Sweet SP. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis.*1997; 3(1):S88-S95.

- Taweekhaisupapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S. In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96: 221-6.
- Tosh FD & Douglas LJ. Characterization of a fucose-binding adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1992; 60(11): 4734-9.
- Ueno Y, Fukumatsu M, Ogasawara A, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T. Hyphae formation of *Candida albicans* is regulated by polyamines. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27(6): 890-92.
- Veiga Jr. VF, Maciel MAM, Pinto AC. Plantas Mediciniais: Cura Segura? *Quim Nova*. 2005; 28: 519-525.
- Verstrepen KJ & Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*. 2006; 60(1): 5-15.
- Vidotto V, Koga-Ito CY, Milano R, Fianchino B, Pontón J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 1999; 16: 208-10.
- Vigo CLS, Narita E, Marques LC. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) *Rev Bras Farmacogn*. 2004; 14(2):137-44.
- Villar CC, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cell. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 262-69.
- Waltimo TM, Ørstavik D, Meurman JH, Samaranayake LP, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15(4): 245-8.
- Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(2):128-37.
- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J*. 1998; 43(4):244-49.
- Whiteway M & Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and hostpathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7: 350-7.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Policy perspectives on medicines: medicina tradicional – necesidades crecientes y potencial. Geneva, 6, 2002.
- Williams DW, Wilson A J, Potts C, Lewis M A O. Phenotypic characterisation of *Candida albicans* isolated from chronic hyperplastic candidosis. *J Med Microbiol*. 2000; 49(2): 199-202.

Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev.*2000; 24(5):661-71.

Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF and Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *J Clin Microbiol.*1999; 37: 3835-43.

Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol.* 2004; 186(6):1838-50.

**ANEXO I.** Composição dos meios de cultura utilizados nos testes.***Meios de cultura*****Meio Completo para levedura**

Peptona	10 g
Extrato de levedura	10 g
Fosfato dibásico de potássio	0,5 g
Glicose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

**Yest Peptone Dextrose (YPD)**

Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Glicose	20 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

**Yest Peptone Dextrose com glicerol a 15%(YPD- glicerol)**

Yest Peptone Dextrose 700 mL

Glicerol 300 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

**RPMI-1640 (meio para teste de susceptibilidade aos antifúngicos)**

L-glutamina 46,5 g

glicose 20 g

Água destilada 1000 mL

Ácido morfolinopropanosulfônico 0,165 M

Ausência de bicarbonato de sódio

Esterilizado por filtração em filtro biológico

**Agar Sabouraud Dextrose**

Peptona 10 g

Glucose 40 g

Agar bacteriológico 15 g

Água destilada 1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

**ANEXO II: Imagens das plantas medicinais estudadas no presente trabalho**



***Allium tuberosum***

fonte: <http://www.chipchaseplants.co>



***Coriandrum sativum***

fonte : <http://upload.wikimedia.org>



***Cymbopogon martinii***

fonte : <http://www.handmadenaturals.co>



***Cymbopogon winterianus***

Fonte: <http://www.jardimdeflores.com.br>



***Santolina chamaecyparissus***

**Fonte:** <http://www.habitas.org.uk>

**ANEXO III – Comitê de Ética em pesquisa aprovado pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (# 008/2003).**



**UNICAMP**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**CERTIFICADO**



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Prevalência de *Candida* spp. em bolsas periodontais e outros sítios da cavidade bucal de pacientes com doença periodontal. Fatores de virulência, susceptibilidade aos antifúngicos e tipagem molecular", sob o protocolo nº **008/2003**, das Pesquisadoras **Letizia Monteiro de Barros**, **Vivian Fernandes Furlletti** e **Priscilla de Laet Sant'Ana Mariano**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **José Francisco Hoffling**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP, em 05 de maio de 2003.

We certify that the research project with title "Prevalence of candida spp in periodontal pockets and other oral sites from patients with periodontal disease.virulence factors, susceptibility tests and genotyping", protocol nº **008/2003**, by Researcher **Letizia Monteiro de Barros**, **Vivian Fernandes Furlletti** and **Priscilla de Laet Sant'Ana Mariano**, responsibility by Prof. Dr. **José Francisco Hoffling**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas), in May 05 2003.



**Prof<sup>a</sup>. Dra. Cynthia Pereira Machado Tabchouy**  
 Secretária  
 CEP/FOP/UNICAMP

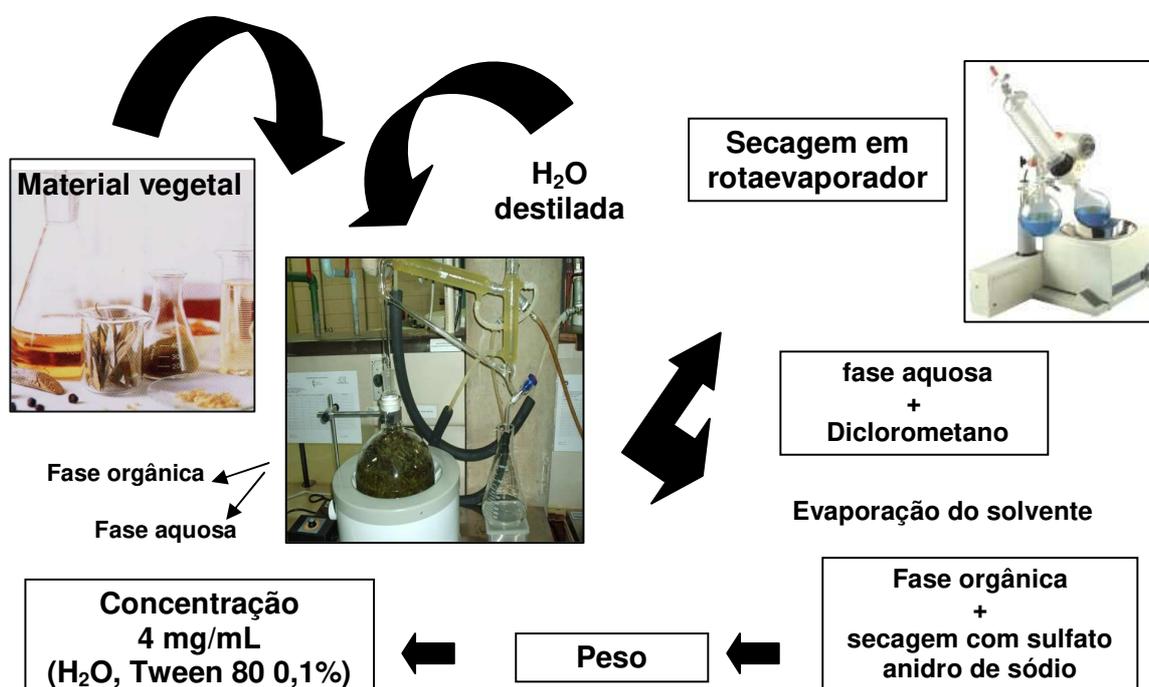


**Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**  
 Coordenador  
 CEP/FOP/UNICAMP

Piracicaba, SP, Brazil, September 03 2004

ANEXO IV: Esquema da metodologia para a extração dos óleos essenciais

# Preparo de Óleos Essenciais



**ANEXO IV:** Esquema da metodologia para a extração dos extratos Vegetais

## ***Preparo de Extratos Vegetais***

