

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CITRAL INIBE PROLIFERAÇÃO DE *Candida albicans* ISOLADAS
DE USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTAIS REMOVÍVEIS

Julliana Cariry Palhano Freire

SAPIENTIA AEDIFICAT

2017

JULLIANA CARIRY PALHANO FREIRE

**CITRAL INIBE PROLIFERAÇÃO DE *Candida albicans* ISOLADAS
DE USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTAIS REMOVÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa

2017

F866c Freire, Julliana Cariry Palhano.
Citral inibe proliferação de *Candida albicans* isoladas de
usuários de próteses dentais removíveis / Julliana Cariry
Palhano Freire. - João Pessoa, 2017.
59 f.: il. -

Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Odontologia. 2. *Candida albicans*. 3. Fitoterapia.
4. Plantas medicinais. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

JULLIANA CARIRY PALHANO FREIRE

CITRAL INIBE PROLIFERAÇÃO DE *CANDIDA ALBICANS*
ISOLADAS DE USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTAIS
REMOVÍVEIS

Banca Examinadora



Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora



Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Lindomar de Farias Belém
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

À Santíssima trindade e Senhora do céu que me guiam e me concedem graças e chuvas de bênçãos. Os planos de Deus são muito maiores e estão acima dos nossos. Seus sonhos para nós acontecem em Seu tempo, basta confiar, entregar e esperar.

Aos meus pais, minha irmã, sobrinhos e à minha família que me apoiam, se alegram e estão comigo em todos os momentos e sempre que preciso. A eles, minha gratidão, respeito e admiração por buscarem o melhor para mim.

Ao meu noivo que me incentivou e ajudou em tudo que precisei. Acreditou em meu potencial, estimulando as minhas habilidades e orientando meu caminho. A todos eles dedico esse trabalho e conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Maria por me preparar e capacitar, abençoar e proteger. Ouvem as minhas preces, aumentam a minha fé por meio de tantas graças concedidas e em tribulações me seguram no colo mostrando que minha vida está escondida e resguardada em Cristo.

Meu muito obrigada aos meus pais Juzênio e Potyra, irmã Stéphanie, sobrinhos e família, os quais querem que o melhor aconteça para mim. Intercedem pela minha vida e são meus alicerces, onde sei que se eu vier a cair, eles me levantarão.

Ao meu noivo Eduardo, registro um profundo agradecimento por estar ao meu lado e me apoiar no mestrado e em todos os momentos. Contribuiu pelo meu crescimento e caminhou junto comigo para que eu conseguisse meus objetivos.

Aos meus tios Teca e Marinésio e a minha prima Marthina por tornarem mais uma vez possível a realização do meu curso demonstrando seu afeto e carinho, me acolhendo em seu lar. Muito obrigada por me concederem tudo que precisei.

Sou imensamente grata à minha querida professora e orientadora Edeltrudes, pessoa maravilhosa e profissional exemplar. Sua forma responsável e objetiva de ser me encantaram, além da simpatia e disponibilidade em ajudar a todos que a procuram e buscam sua orientação. Ela acompanha e está sempre ao lado de seus alunos, ensinando e tornando possível os sonhos dos que nela confiam. Muito obrigada professora por este trabalho que fizemos. A senhora é o exemplo de mestre que devemos ser!

Meus agradecimentos aos professores que compuseram a banca em Seminários, qualificação e defesa: Ricardo, Felipe, Leopoldina, Lindomar e André, foram solícitos ao participar das avaliações e aprimoramento dessa pesquisa, estão sempre compartilhando todo o conhecimento. Minha admiração pelos profissionais que são e sabedoria que possuem.

Obrigada a minha amiga Marina pela amizade, companheirismo, duplicidade. Minha eterna gratidão por toda sua ajuda, sempre solícita, sempre

disponível para ajudar, acompanhar. A grande incentivadora e intercessora para que eu fizesse o curso. Tornou possível a realização dele com seu apoio.

Agradeço também aos colegas Klidenberg e Danielle por ajudarem nos trabalhos de laboratório. Meu sincero respeito e admiração pela disponibilidade em ajudar. O companheirismo e atenção dada por eles permitiram a conclusão desse trabalho.

*“Vou te ensinar, dizeis, vou te mostrar o caminho que deves seguir; vou te instruir,
fitando em ti os meus olhos.”*
(Salmos 32:8)

RESUMO

Próteses removíveis são consideradas potencialmente facilitadoras de estomatite protética. A infecção por *Candida* sp. é uma causa bastante comum, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente e mais frequentemente associada a essa patologia. O estudo de produtos naturais à base de plantas medicinais para combater esse tipo de infecção mostra-se como um método alternativo de tratamento, visto que a resistência das espécies frente aos agentes antifúngicos licenciados, assim como os efeitos adversos e toxicidade desses medicamentos tem aumentado. Essa pesquisa analisou a atividade antifúngica do citral, selecionado a partir de um *screening*, frente a cepas clínicas de *C. albicans* isoladas de usuários de próteses. Foram utilizadas 21 cepas isoladas e identificadas, sendo uma padrão (ATCC 76645). Inicialmente, foi realizado um *screening* para a escolha de um produto natural, com os seguintes óleos essenciais: *Mentha piperita* L.(Briq); *Origanum Vulgare*; *Zingibre officinale* L. e os fitoconstituintes: citral e limoneno. Dentre eles, o citral produziu melhor resposta antifúngica e foi selecionado para os ensaios biológicos. Os produtos-teste foram compostos pelo fitoconstituente citral e pela nistatina. Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) pelo método de microdiluição. Em seguida foi realizada a análise micromorfológica, cinética de morte microbiana e ensaio de modulação. Os dados foram analisados descritivamente. A CIM e CFM do citral foram estabelecidas na concentração de 32 µg/mL, apresentando atividade fungicida. Todas as leveduras de origem clínica, demonstraram ser resistentes à nistatina, mas *C.albicans* ATCC 76645 foi sensível, com CIM correspondendo a 256 µg/mL. Houve alteração na micromorfologia das cepas expostas ao citral, verificando menos estruturas fúngicas. Na cinética de morte microbiana, a cepa clínica demonstrou redução no crescimento igual a 3 log₁₀ UFC/mL em duas horas de exposição ao citral na CIM e CIMx2. Não houve crescimento fúngico nos tempos avaliados da cepa padrão quando exposta às concentrações do citral, assim como da *C.albicans* clínica submetida à CIMx4. O citral não modulou a atividade da nistatina sobre a resistência das cepas estudadas. Essa pesquisa revelou o potencial promissor do citral, sendo este caracterizado como um agente fungicida, e o destaque da resistência das cepas clínicas de *C.albicans* frente a nistatina.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Fitoterapia; Plantas medicinais.

ABSTRACT

Removable prostheses are considered to be potentially facilitators of prosthetic stomatitis. *Candida* sp. infection is a very common cause, with *Candida albicans* being the most prevalent and most frequently associated with this pathology. The study of natural herbal products to combat this type of infection appears as an alternative method of treatment, since the resistance of the species to the licensed antifungal agents as well as the adverse effects and toxicity of these drugs has increased. This research analyzed the antifungal activity of citral, selected from a screening, against clinical strains of *C. albicans* isolated from prosthesis users. Twenty-one isolates were identified and identified as one standard (ATCC 76645). Initially, a screening was performed for the selection of a natural product, with the following essential oils: *Mentha piperita* L. (Briq); *Origanum Vulgare*; *Zingibre officinale* L. and citral and limonene phytochemicals. Among them, citral produced better antifungal response and was selected for biological assays. The test products were composed by the citrus phytoconstituent and nystatin. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by the microdilution method. Micromorphological analysis, microbial death kinetics and modulation were performed. Data were analyzed descriptively. The CIM and MFC of citral were established at the concentration of 32 µg/mL, showing fungicidal activity. All yeasts of clinical origin were found to be resistant to nystatin, but *C. albicans* ATCC 76645 was sensitive, with MIC corresponding to 256 µg/mL. There was a change in the micromorphology of the strains exposed to the citral, verifying less fungal structures. In the kinetics of microbial death, the clinical strain showed a reduction in growth equal to 3 log₁₀ CFU/mL in two hours of citral exposure in the MIC and CIMx2. There was no fungal growth in the evaluated times of the standard strain when exposed to citral concentrations, as well as clinical *C. albicans* submitted to CIMx4. Citral did not modulate the activity of nystatin on the resistance of the studied strains. This research revealed the promising potential of citral, being characterized as a fungicidal agent, and the highlight of the resistance of clinical strains of *C. albicans* to nystatin.

Keywords: *Candida albicans*; Phytotherapy; Plants, Medicinal.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- EP = estomatite protética
- spp = espécies
- OE = óleo essencial
- *C. albicans* = *Candida albicans*
- *C. krusei* = *Candida krusei*
- *C. tropicalis* = *Candida tropicalis*
- CIM = Concentração Inibitória Mínima
- CFM = Concentração Fungicida Mínima
- CSD = Caldo Sabouraud Dextrose
- ASD = Ágar Sabouraud Dextrose
- UI/mL = unidades internacionais por mililitro
- mL = mililitro
- µL = microlitro
- µg/mL = microgramas por mililitros
- mg/mL = miligramas por mililitros
- mm = milímetros
- UFC/mL = unidades formadoras de colônias por mililitro
- TCLE = Termo de consentimento livre e esclarecido
- *et al* = e colaboradores
- °C = graus Celsius

- h = hora
- RPMI = Roswell Park Memorial Institute
- ATCC = American Type Culture Collection
- YNB = Yeast Nitrogen Base
- YCB = Yeast Carbon Base
- DMSO = dimetil-sulfóxido

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão de literatura	16
3. Proposição	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos	22
4. Material e métodos	23
4.1 Local do estudo	23
4.2 Desenho do estudo	23
4.3 Coleta, Isolamento e identificação das espécies de <i>Candida</i>	25
4.3.1 Coleta e Isolamento do material biológico	25
4.3.2 Identificação de <i>Candida</i> sp	26
Prova do Tubo Germinativo	26
Microcultivo de leveduras	26
Auxanograma	27
Assimilação de Carboidratos	27
Assimilação de nitrogênio	27
Fermentação de carboidratos	28
4.4 Ensaio biológico	28
4.4.1 Produtos utilizados	28
4.4.2 Antifúngico padrão licenciado	29
4.4.3 Meios de cultura	29
4.4.4 Micro-organismos e inóculo	30
4.4.5 Ensaio biológico	30
Screening, determinação da CIM e CFM	30

Micromorfologia_____	32
Cinética de morte microbiana_____	32
Ensaio de modulação_____	33
4.5 Análise dos dados_____	34
5. Resultados_____	35
6. Discussão_____	43
7. Conclusão_____	48
Referências_____	49
Anexos_____	56
Anexo 1 - Certidão de aprovação do Comitê de Ética_____	56
Apêndices_____	57
Apêndice 1 Carta de Anuência_____	57
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido_____	58
Apêndice 3 – Folheto de orientações_____	59

1. INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma reação inflamatória prevalente em pacientes usuários de próteses e a infecção por *Candida* é o seu principal fator etiológico^{20,27,70}. A *C. albicans* é a espécie fúngica mais conhecida e associada à manifestação clínica da EP. Além de *C. albicans*, outras espécies menos comuns, como: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* são reconhecidas como patógenos presentes na microbiota bucal e que podem se tornar patogênicas^{34,40}.

Há que se ressaltar que a estomatite protética associada a *Candida* não é de fácil tratamento e com frequência apresenta recidiva²⁰. Infecções por *Candida* tem se tornado um grave problema de saúde, pois há uma crescente resistência dos fungos às drogas disponíveis no mercado, com uma alta taxa de recidivas, o que faz com que novas drogas devam ser pesquisadas e avaliadas quanto a sua eficácia no tratamento antifúngico^{27,36,39}.

Na odontologia, a fitoterapia já vem sendo usada com sucesso há vários anos. Trata-se de um meio terapêutico promissor no campo farmacológico^{44,56,57}. O citral é um fitoconstituente presente em diversos óleos essenciais utilizados pela população, como o *Cymbopogon citratus*⁵⁶. Algumas propriedades farmacológicas do citral tem sido relatadas na literatura como antitumoral⁶⁹, broncodilatadora³⁸, antiprotozoária⁸ e antimicrobiana^{28,35,36,49,59,72}.

Porém ainda são poucos os estudos sobre o modo de ação antifúngica e a associação do citral com medicamentos licenciados contra cepas clínicas de *C. albicans* de origem protética. Nesse contexto, o presente estudo analisou a atividade antifúngica do fitoconstituente citral, selecionado a partir de um *screening* com cinco produtos naturais, frente a cepas de *C. albicans* isoladas de usuários de próteses.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Estomatite Protética associada a *Candida spp.*

No ambiente oral, a estomatite associada a *Candida spp.* é a forma mais prevalente de candidíase oral. Esta patologia afeta uma vasta gama de portadores de próteses, com prevalência variando entre 35% a 75%, dependendo da população investigada⁷¹.

Próteses mucossuportadas são consideradas facilitadoras, em potencial da estomatite protética associada a *Candida spp.*, a qual apresenta aspecto eritematoso, difuso ou pontilhado da mucosa palatina sob a base das próteses. A etiologia da doença é multifatorial, embora a infecção por *Candida sp.* seja a causa mais frequente^{34,39}. Por ser assintomática na maioria dos casos, os indivíduos portadores não sabem de sua existência. O tratamento se faz necessário, pois a EP pode servir de reservatório para outras infecções mais extensas⁵¹.

Embora existam vários fatores predisponentes, a presença de *Candida spp.* no biofilme da prótese é tida como o fator mais importante para o estabelecimento da estomatite protética. Apesar disto, não depende apenas da presença de espécies de *Candida* para se desenvolver³⁴.

Alguns fatores relacionados à sua ocorrência são: a adaptação deficiente da prótese, fato que gera instabilidade e trauma no rebordo subjacente; o uso contínuo, a não remoção para dormir e a higiene inadequada da mesma, atitudes que favorecem a diminuição do fluxo salivar e do pH da saliva; o tempo de uso da prótese, pois com o passar do tempo a prótese perde suas condições ideais, tanto do material de base, quanto da oclusão e adaptação^{7,20,61,70}.

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos e como causa de candidíase em várias partes do mundo^{21,62}. É a mais encontrada dentre as espécies de *Candida* presentes no biofilme, porém bactérias também podem estar presentes nessa patologia⁷¹. Estudos comprovaram haver interação entre bactérias e fungos

observando um aumento da aderência de *C. albicans* na presença de estreptococos^{63,65}.

Trata-se da espécie de *Candida* com maior conhecimento patogênico, devido à diversidade de fatores de virulência^{21,62}. A virulência de *C. albicans* relaciona-se com a sua capacidade de formar biofilmes em uma variedade ampla de superfícies, para crescer e proliferar como hifas, produzir e secretar enzimas proteolíticas, e prejudicar a resposta imune do hospedeiro^{1,67,68}.

Estímulos locais podem desencadear os fatores de virulência como o pH e a distribuição de nutrientes. Na estomatite protética, é evidente a redução do fluxo salivar entra a superfície da prótese e o epitélio, contribuindo assim para o acúmulo de biofilme^{48,68}.

Habitualmente se considera que a origem de *C. albicans* causadora de infecções seja a microbiota do trato digestório humano (organismo comensal). *C. albicans* foi o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado (organismo diploide com oito pares de cromossomos), o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço na biologia deste fungo⁶².

Classificação clínica de Newton⁴³

A estomatite protética é classificada de acordo com a aparência clínica da mucosa inflamada em três tipos clínicos:

- Hiperemia Puntiforme (classe I): hiperemia dos ductos de glândulas salivares palatinas menores; aspecto eritematoso puntiforme, podendo ocupar áreas dispersas ou pequenas áreas localizadas no palato;
- Hiperemia Difusa (classe II): apresenta mucosa lisa e atrófica, com aspecto eritematoso em toda região sob a prótese;
- Hiperemia Granular (classe III): frequentemente associada à câmara de sucção, acomete a região central do palato com aparência clínica nodular e rugosa da mucosa.

Tratamento da estomatite protética associada a *Candida*

O diagnóstico da estomatite por *Candida* ocorre pela associação do quadro clínico com os resultados de exames laboratoriais, os quais incluem a citopatologia e a cultura microbiológica. O tratamento da estomatite protética inclui condutas de higiene bucal e da prótese, com remoção da prótese durante a noite, identificação e correção de fatores predisponentes, reembasamento ou confecção de nova prótese e terapia antifúngica quando associada à candidíase bucal¹⁴.

As três principais classes de antifúngicos usados, atualmente, no tratamento da candidíase são os polienos, os quais se ligam ao ergosterol e modificam a permeabilidade da membrana plasmática (como Nistatina e Anfotericina B), os derivados azólicos (Miconazol, Fluconazol e Itraconazol), os quais inibem a enzima 14 α lanosterol-dimetilase, e as equinocandinas (caspofugina) que inibem a enzima β -1,3 glucana sintase, desestabilizando a parede celular dos fungos. Geralmente, o tratamento inicial é feito com um agente tópico. Nistatina e miconazol são as drogas de escolha inicial. Caso a terapêutica tópica não apresente resultados, é iniciado o tratamento sistêmico, sendo o fluconazol a droga mais prescrita^{9,45}.

Frente à resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos sintéticos observa-se o uso de produtos naturais, na tentativa de obter-se melhor desempenho sobre tais micro-organismos³⁶. A utilização de fitoterápicos como tratamento alternativo se difere por apresentar uma diversidade molecular superior aos sintéticos, proporcionando novas descobertas, com pesquisa das atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças⁵.

Plantas medicinais utilizadas pela população

A etnomedicina se destaca por associar as informações obtidas junto à comunidade, que utiliza a flora medicinal para tratar doenças, a estudos laboratoriais que constatarem ou não a presença de substâncias ativas capazes de fornecer a ação terapêutica relatada pela população⁵⁸.

Em uma revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em patógenos orais, Vieira *et al*⁶⁶ (2014) avaliaram trinta e quatro trabalhos de investigação do uso de espécies vegetais em afecções orais e encontraram como resultado quarenta e sete famílias botânicas referidas pelos estudos, com maior número de citações para Anacardiaceae, seguida de Compositae, Meliaceae, Lamiaceae, Solanaceae e Zingiberaceae. Foram referidas cento e onze espécies vegetais, sendo *Anacardium occidentale* L., *Zingiber officinale* Roscoe e *Punica granatum* L. as mais citadas.

Cordeiro e Félix¹² (2014) realizaram um levantamento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas utilizadas na medicina popular no agreste da Paraíba, Brasil. Encontraram as espécies com maior número de citações: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira), *Genipa americana* L. (Jenipapo), *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba) e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (Angico). Tais espécies são amplamente utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, tais como problemas do aparelho respiratório, inflamações e doenças do sangue.

Em uma pesquisa de plantas medicinais utilizadas na região Nordeste do Brasil Agra *et al*⁴ (2008) encontraram como destaque as famílias Aspleniaceae, Cyatheaceae, Equisetaceae, Polypodiaceae e Selaginellaceae. A família Poaceae, na qual se encontra as espécies que apresentam o citral como fitoconstituente (capim limão, citronela e erva cidreira), foi citada em levantamentos etnobotânicos presentes na literatura^{4,12,66}.

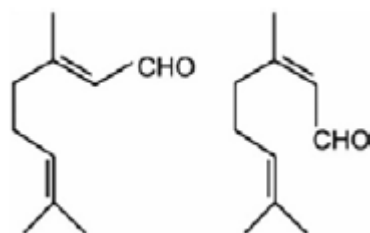
Monoterpeno citral e estudos relacionados

Os produtos vegetais e especialmente os óleos essenciais podem ser explorados como terapias alternativas. Óleos essenciais têm sido utilizados na etnomedicina como agentes antifúngicos contra infecções por *Candida*²⁸. São constituídos principalmente de terpenóides, amplamente distribuídos na natureza⁶⁰. Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas⁵⁴. Os terpenos formam classes estrutural e funcionalmente diferentes. Eles são feitos pelas

combinações de várias unidades de 5-carbono-base (C5) chamado isopreno. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15)⁶.

Citral é o nome dado a uma mistura natural de dois aldeídos de monoterpeno acíclicos isoméricos: geranial (*trans*-citral, citral A) e neral (*cis*-citral, citral B). Estão presentes em diversos óleos essenciais, como o *Lemongrass* (erva-cidreira), e corresponde ao principal constituinte do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* de nome popular: capim-santo, capim-limão, entre outros^{6,49,64}.

Figura 1: Moléculas do citral (C₁₀H₁₆O)



Silva *et al*⁶⁶ (2008) estudaram a atividade antifúngica do óleo de citronela e citral e constataram potencial *in vitro* contra espécies de *Candida*, incluindo a *C.albicans*.

Zore *et al*⁷² (2011) avaliaram o potencial anti-*Candida* de seis terpenoides (Linalol, citral, eugenol, citronelol, benzoato de benzila e acetato de linalol), os quais demonstraram excelente atividade contra *C.albicans* e não *albicans*, sendo o linalol e citral os mais eficazes, inibindo todos os isolados.

Khan e Ahmad²⁸ (2012) pesquisaram a atividade antibiofilme de quatro fitocompostos (cinamaldeído, citral, eugenol e geraniol) e sua sinergia com fluconazol e anfotericina B contra biofilmes pré-formados de *C. albicans*. Entre os resultados obtidos, o citral inibiu a formação de biofilmes, porém sendo menos eficaz que o cinamaldeído e geraniol.

Em um estudo sobre a atividade contra *Candida*, Lima *et al*⁶⁶ (2012) verificaram que o citral inibe o crescimento de *C.albicans*, sendo que o provável mecanismo de ação não envolveu a parede celular ou o ergosterol.

Leite *et al*³⁵ (2014) analisaram a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do citral frente cepas de *C.albicans*, concluindo que o envolvimento com a parede celular e a ligação ao ergosterol não são possíveis mecanismos de ação, e demonstraram seu potencial antifúngico contra as cepas de *C.albicans*. Os autores ressaltaram a necessidade de mais estudos sobre seus efeitos antes de ser utilizado como componente de novos medicamentos antifúngicos.

3. PROPOSIÇÃO

3.1) Geral

Selecionar o produto que apresentar melhor atividade antimicrobiana a partir de um *screening*, sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de usuários de prótese e avaliar a ação antifúngica do produto selecionado sobre essas leveduras.

3.2) Específicos

- Coletar, isolar, identificar leveduras de *C. albicans* da cavidade bucal de usuários de prótese removível (total ou parcial);
- Realizar um *screening* de cinco produtos naturais (óleos essenciais – orégano, menta e gengibre; fitoconstituintes – citral e limoneno) de origem vegetal a fim de determinar o produto que apresentar melhor resposta antifúngica.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do produto escolhido a partir do *screening* e da nistatina sobre cepas clínicas e padrão de *C. albicans*.
- Avaliar a interferência dos produtos isolados sobre a micromorfologia das leveduras;
- Determinar a cinética de morte microbiana na presença do produto natural selecionado;
- Determinar a ação moduladora do produto natural selecionado sobre a nistatina frente às cepas de *C. albicans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Local do estudo

A coleta do material biológico foi realizada na Comunidade Recanto do Poço, Cabedelo – PB, Brasil (Carta de Anuência - Apêndice 1). A identificação das leveduras e as análises referentes ao estudo da atividade antifúngica dos produtos naturais selecionados foram realizadas no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba. Os ensaios se iniciaram em agosto de 2016 e foram concluídos em maio de 2017.

4.2) Desenho do estudo

Trata-se de pesquisa laboratorial com abordagem indutiva, procedimento comparativo estatístico e técnica de observação direta intensiva³³.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CEP-CCS), sob nº de protocolo 0395/16, de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS (Anexo 1). Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Apêndice 2).

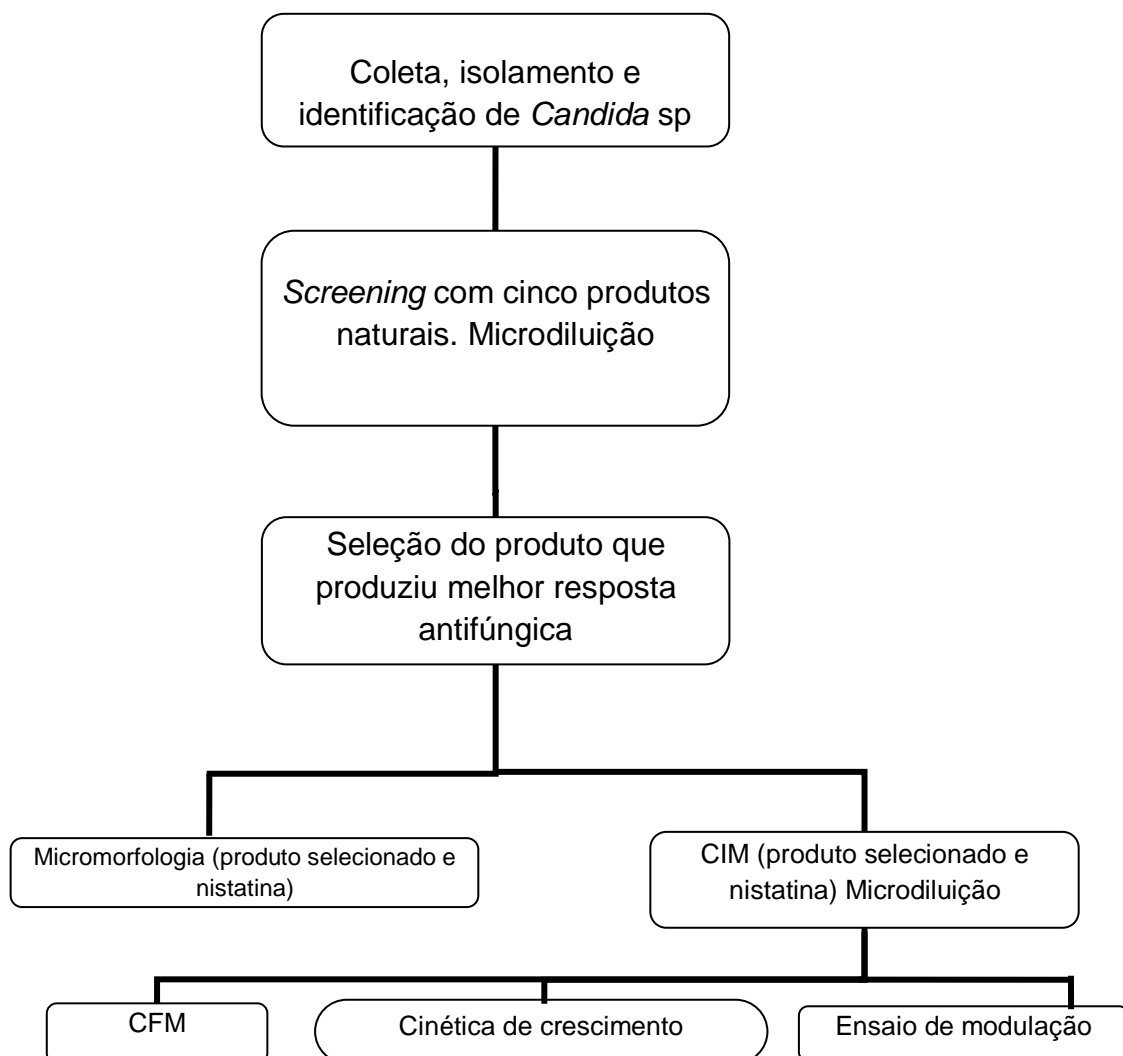
Dentre os critérios de inclusão, participaram adultos, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, que utilizavam próteses removíveis (totais ou parciais – com ou sem estrutura metálica). Foram incluídos usuários de próteses saudáveis ou com diagnóstico clínico de estomatite protética.

A amostra por conveniência foi composta por 21 cepas de *C. albicans*, sendo vinte cepas clínicas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal e das bases das próteses, e uma padrão ATCC 76645, pertencente à micoteca do laboratório de Micologia - UFPB.

Foi entregue aos participantes que apresentaram estomatite protética associada à *Candida* o resultado do exame micológico e o antifúngico padrão Nistatina solução oral 100.000 UI/ml, com as devidas recomendações de uso. Todos os participantes da pesquisa receberam orientações sobre cuidados com a saúde bucal e com a prótese dentária (Apêndice 3).

A sequência da metodologia utilizada no estudo se encontra na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma do plano experimental dos ensaios antifúngicos realizados.



4.3) Coleta, Isolamento e Identificação do gênero *Candida*

A coleta do material biológico, bem como o isolamento e identificação das espécies de *Candida* foram realizados seguindo os critérios estabelecidos por Looder³⁷ (1970); Hoog e Garro²⁵ (1995); Kurtzmann e Fell³² (1998); Sidrim e Rocha⁵⁵ (2004).

4.3.1) Coleta e Isolamento do material biológico

Na coleta do material biológico para isolamento e identificação de espécies de *Candida* de usuários de prótese foram utilizados dois swabs (INLAB® Confiança, Brasil) estéreis. O primeiro umedecido em solução fisiológica esterilizada, aplicado no palato duro da cavidade bucal do participante com movimentos de vai e vêm (fricção), por 30 segundos, e inserido em um tubo de ensaio com Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (Difco Laboratories Ltda. USA/France) para o transporte até o laboratório. O segundo swab foi friccionado sob a base da prótese (a qual fica em contato com a mucosa) e imerso em outro tubo com CSD. A identificação das leveduras foi realizada com base na macro e micromorfologia, provas fisiológicas e bioquímicas.

O material biológico coletado foi inoculado em placas de Petri descartáveis 15x90 mm (Dispopetri), contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltda. USA/France), adicionado de cloranfenicol a 100 µg/mL (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA). Decorrido o período de 24-48h em estufa bacteriológica a 35±2°C as colônias crescidas e com aspectos de fungos leveduriformes foram isoladas em CHROMOagar-*Candida* (Difco Laboratories Ltda. USA/France) e após a verificação do crescimento nas placas as colônias foram avaliadas quanto à coloração e ao morfotipo. Após esta avaliação, a identificação presuntiva foi realizada.

A coloração verde claro a médio da colônia indica presença da *C. albicans*, a coloração azul escuro a azul metálico indica *C. tropicalis*, a rosa claro com

bordas esbranquiçadas indica *C. krusei* e as outras leveduras podem aparecer tanto na sua cor natural (creme) ou cor de malva claro/escuro (exemplo *C. glabrata* e outras espécies), segundo os critérios estabelecidos pelo fabricante. Os meios de culturas foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e os cultivos incubados a temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h.

4.3.2) Identificação das espécies de *Candida*

Os seguintes testes foram realizados para a identificação da espécie de *Candida*:

Prova do Tubo Germinativo

Retirou-se uma alíquota de uma colônia da levedura com uma alça de platina calibrada (0,001mL) e, em seguida, emulsionou-se de forma asséptica em 0,5 mL de soro. Incubou-se a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 1,5-2 h em banho-maria. Finalizando este período, foi removida uma gota da suspensão e montada uma preparação do tipo lâmina-lamínula, para observação microscópica.

O tubo germinativo, quando o teste é positivo, aparece como filamento fino e cilíndrico, originado do blastoconídio da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constricção, quer na base ou ao longo de sua extensão.

Microcultivo de Leveduras

Colocou-se 3 mL de Ágar Fubá, ainda líquido, sobre a lâmina do microcultivo, com pipeta estéril. Quando o meio se solidificou, com alça de platina, foi apreendida uma alíquota da colônia de levedura e semeada em estria no Ágar Fubá e, em seguida, coberta com lamínula estéril.

Após 2 a 3 dias à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ a preparação foi observada em microscópio com aumento de 40x, identificando-se as características morfológicas inerentes às leveduras, como pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras.

Provas bioquímicas realizadas conforme protocolo de Sidrim e Rocha⁵⁵ (2004): Auxanograma (Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio); e Fermentação de carboidratos

Assimilação de Carboidratos:

Preparou-se o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco Laboratories Ltda. USA/France) de acordo com as normas preconizadas pelo fabricante, e uma suspensão de leveduras com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Uma alíquota de 2 mL desta suspensão de leveduras foi adicionada a 38 mL de meio basal fundido e resfriado, sendo transferida para uma placa de Petri e homogeneizada suavemente. Após a solidificação do meio, discos impregnados com açúcares foram posicionados em locais previamente demarcados.

As fontes de carbono utilizadas foram: dextrose, lactose, sacarose, maltose, trealose, celobiose, melibiose, L-arabinitol, arabinose, glucosamina, sorbitol, inositol, melizitose, galactose e ramnose. Incubou-se a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48h e foram observadas regiões opacas ao redor dos açúcares assimilados.

Assimilação de Nitrogênio:

Preparou-se o meio Yeast Carbon Base (YCB) (Difco Laboratories Ltda. USA/France), de acordo com as indicações do fabricante. E em 19mL deste meio resfriado foi acrescentado 1mL da suspensão de levedura previamente preparada (com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland). Após a homogeneização e solidificação do meio, foram distribuídos discos impregnados de compostos nitrogenados (nitrato de potássio e peptona). A peptona foi empregada como controle da viabilidade do inóculo, visto que todas as leveduras a utilizam como fonte nitrogenada. Incubou-se a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48h e foram observadas regiões opacas ao redor dos compostos nitrogenados assimilados.

Fermentação de Carboidratos:

Preparou-se o meio basal para fermentação e distribuiu-se em tubos de ensaio, contendo um tubo de Durham invertido em seu interior, em alíquotas de 3 mL. Em seguida foi adicionado ao meio 1,5 mL da solução de açúcares (6% em água destilada), mantendo sempre a relação de $\frac{1}{2}$ da solução de açúcares para meio basal, 0,2 mL da suspensão de levedura (turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland). Incubou-se os tubos em estufa bacteriológica a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10-14 dias e observou-se a produção de CO_2 através da visualização de bolhas.

4.4) Ensaio biológicos

4.4.1) Produtos utilizados

Os produtos naturais usados no *screening* e nos ensaios biológicos estão registrados no Quadro 1. Selecionou-se o produto que produziu melhor resposta antifúngica no *screening* para os demais ensaios biológicos. Sendo assim, os grupos-teste foram constituídos pelo citral e nistatina.

Todos os produtos utilizados foram devidamente solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e Tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3 mL) para obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Quadro 1: Produtos naturais de origem vegetal utilizados no estudo.

Óleo essencial (OE)				
Nome Científico	Família	Nome popular	Lote	Fabricante
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano	0149/05209/F	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Gengibre	0717/05209/F	Quinari Fragância e cosméticos LTDA, Ponta Grossa, PR, Brasil
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Menta	0809/05209/F	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil
Fitoconstituintes				
Nome	Fórmula molecular		Lote	Fabricante
Citral	$C_{10}H_{16}O$		STBC5273V	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil
Limoneno	$C_{10}H_{16}$		58296DK	Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil

4.4.2) Antifúngico licenciado

O medicamento licenciado utilizado nos ensaios biológicos foi a nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

4.4.3) Meios de cultura

Para os ensaios de atividade antifúngica foi utilizado RPMI 1640/ sem bicarbonato (Sigma-Aldrich®/Stenheim/Alemanha) e Ágar Sabouraud com antibiótico – ASD e ASDA (Difco®/USA/France). Os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.4) Micro-organismos e inóculo

Foram selecionadas vinte cepas clínicas de *C.albicans* isoladas da cavidade bucal e da base da prótese do participante (LM-3B; LM-3P; LM-4B; LM-4P; LM-5B; LM-5P; LM-7B; LM-7P; LM-8B; LM-8P; LM-9B; LM-9P; LM-10B; LM-10P; LM-11B; LM-11P; LM-12B; LM-12P; LM-13B; LM-13P) e uma cepa padrão *C.albicans* ATCC 76645.

Para o procedimento de preparação do inóculo das leveduras, os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h (overnight). Foram preparadas suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,9% estéril (Farmax - Distribuidor Ltd., Amaral, Divinópolis, MG, Brasil). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil).

Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^6UFC/mL . Em seguida, essa suspensão foi diluída com água destilada numa proporção de 1:10 resultando em um inóculo contendo aproximadamente 10^5UFC/mL , que foi utilizado nos ensaios^{10,11,22,50}.

4.4.5) Ensaio biológico

Screening, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

O *screening* dos produtos naturais e a determinação da CIM do produto selecionado foram realizados pela técnica de microdiluição, executada em triplicata, utilizando microplacas com fundo em “U”, esterilizadas, contendo 96 orifícios (Kasvi, Itália)^{10,17,22,31,42,50}.

Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 μL do meio líquido RPMI (Sigma-Aldrich®/São Paulo, SP/Brasil) duplamente concentrado. Posteriormente, 100 μL dos produtos, também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, que foram diluídos

seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, obtendo-se concentrações de 1024 µg/mL até 128 µg/mL para o *screening* e de 1024 µg/mL até 2 µg/mL para a determinação da CIM, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração.

Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Foram feitos controles de viabilidade das cepas fúngicas e do meio líquido nas mesmas condições do ensaio. As placas foram seladas e incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48h. Define-se a CIM para os produtos usados nos ensaios biológicos como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle.

Utilizou-se como critérios para determinação da CIM os seguintes valores: 50 a 500 µg/mL considerados com forte/ótima atividade antimicrobiana; 600 a 1500 µg/mL possuem atividade moderada; acima de 1500 µg/mL, atividade fraca ou produto inativo^{26,52}.

Após determinação da CIM, alíquotas 10 µL do sobrenadante das cavidades correspondentes à concentração inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram subcultivadas em placas de microdiluição com fundo em "U", esterilizadas, com 96 orifícios (Kasvi, Itália) contendo 100 µL RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/Stenheim/Alemanha) e incubadas por 24-48h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

O crescimento microbiano foi verificado visualmente com base nos controles e determinada a CFM para cada cepa. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela moda das CFM's obtidas nos três ensaios¹⁹.

A relação CFM/CIM foi calculada de forma a determinar se a substância possui uma atividade fungistática ($\text{CFM/CIM} \geq 4$) ou fungicida ($\text{CFM/CIM} < 4$)⁴⁹.

Efeito dos produtos teste isolados sobre a micromorfologia de *C. albicans*

Para o estudo de possíveis alterações na micromorfologia de *C. albicans* foi empregada a técnica de microcultivo em lâmina em placa de Petri (câmara úmida)¹⁵. O meio de cultura ágar-fubá-Tween 80 fundido foi fracionado em tubos estéreis contendo os produtos testes isolados em concentração correspondente a CIM. Também foi utilizado um tubo apenas com o meio de cultura (Controle). Após homogeneização, cada meio de cultura foi espalhado sobre uma lâmina de vidro.

Repiques de 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ágar Sabouraud dextrose de *C. albicans* foram semeados e as placas foram incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48h. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, em um aumento de 400x, para observação da formação ou não de estruturas características como blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios.

Efeito dos produtos teste isolados sobre a cinética de morte microbiana

O estudo da interferência do produto teste isolado sobre a curva de tempo de morte das cepas fúngicas foi realizado utilizando a metodologia de Klepser *et al*^{β0} (1998), com alguns aprimoramentos.

Para a realização da cinética de morte microbiana foram utilizadas duas cepas, uma padrão da American Type Culture Collection (ATCC 76645) e outra cepa clínica (LM-8B), as quais demonstraram inibição de crescimento quando expostas ao citral. Neste ensaio, frente às concentrações inibitórias mínimas do citral foi observado o comportamento das cepas de leveduras selecionadas ao longo de 24h.

Inicialmente, 100 μL RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®/São Paulo-SP/Brasil) foram adicionados em uma microplaca com fundo em "U" com 96 orifícios utilizando 10 μL do sobrenadante das cavidades correspondente à concentração inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM, CIMx2 e CIMx4) e incubadas por um período 24-48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Em seguida o plaqueamento do inóculo foi realizado em Placa Petri (Alamar Tecno Científica LTDA®) contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud

Dextrose (Difco®), e uma alíquota de 10 µL do inóculo foi retirado com uma alça bacteriológica calibrada (INLAB Confiança, Brasil) e posteriormente semeado de forma uniforme em formato de estrias ao longo da superfície do meio ASD, durante os intervalos de tempo 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h. As placas inoculadas foram incubadas a 35±2°C por 48 horas.

O experimento foi realizado em triplicata. As curvas foram construídas plotando a contagem média de colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo (horas) com o GraphPad Prism 5.0 (Programa GraphPad for Windows, San Diego, CA - USA). Foi considerada atividade fungicida da droga quando houve redução no crescimento maior ou igual a 3 \log_{10} ($\geq 99,9\%$) a partir do inóculo inicial, e atividade fungistática quando houve redução no crescimento menor que 3 \log_{10} ($< 99,9\%$) UFC/MI³⁰.

Avaliação da interferência do citral sobre a resistência das cepas à nistatina (ensaio de modulação)

Para avaliar a ação moduladora do citral sobre a nistatina frente às cepas de *C. albicans*, a CIM deste antifúngico foi determinada, pela técnica de microdiluição, utilizando microplacas com fundo em “U”, esterilizadas, contendo 96 orifícios (Kasvi, Itália), na presença do citral em concentração sub-inibitória (CIM/8)^{13,16}.

Emulsionou-se o citral a 4 µg/mL em meio RPMI 1640 de forma a se obter uma solução de 100 µg/mL. Em seguida, adicionou-se essa solução em todos os poços da microplaca. Posteriormente, foi dispensado na cavidade da primeira linha 100 µg/mL da nistatina de forma a se obter concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL, pela microdiluição (retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora). Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada coluna se referiu a um tipo de cepa.

O valor da CIM do antifúngico padrão foi então comparado na ausência e presença do citral CIM/8. As placas foram incubadas durante 24-48h a 35±2°C para avaliação do crescimento fúngico. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5) Análise dos dados

Os dados foram analisados através de estatística descritiva por meio do programa Microsoft Excel 2010.

5. RESULTADOS

Dentre os cinco produtos naturais, o citral foi o que obteve melhor resposta antifúngica frente à *C.albicans*, sendo selecionado então para os demais ensaios antifúngicos. Os valores obtidos pelo *screening* são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados do *screening* dos produtos para avaliação da resposta antifúngica. Técnica de microdiluição (1024 µg/mL a 128 µg/mL).

Produto	CIM(µg/mL)
<i>Origanum vulgare</i> L.	256
<i>Zingiber officinale</i>	+
<i>Mentha piperita</i> L.	256
Citral	128
Limoneno	256

+: crescimento do micro-organismo

Os resultados da CIM e da CFM do citral e nistatina referentes às 20 cepas clínicas de *C.albicans* isoladas de usuários de próteses e da cepa padrão (*C.albicans* ATCC 76645) estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da avaliação da CIM e CFM do citral e da nistatina e relação CIM/CFM do citral sobre *C.albicans*.

<i>C. albicans</i>	Citral (µg/mL)				Nistatina (µg/mL)	Controle das cepas	Controle do meio de cultura
	CIM	CFM	CFM/CIM	Atividade antifúngica	CIM		
3B	64	64	1	Fungicida	+	+	-
3P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
4B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
4P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
5B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
5P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
7B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
7P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
8B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
8P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
9B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
9P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
10B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
10P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
11B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
11P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
12B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
12P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
13B	32	32	1	Fungicida	+	+	-
13P	32	32	1	Fungicida	+	+	-
ATCC 76645	32	32	1	Fungicida	256	+	-

+ : crescimento de micro-organismo

- : sem crescimento de micro-organismo

As avaliações micromorfológicas das cepas de *C. albicans* na ausência e presença dos produtos sob microscópio óptico estão notificados na Tabela 3 e Figura 2.

Tabela 3: Análise micromorfológica de *C.albicans* na ausência (controle) e presença do citral e nistatina.

<i>C.albicans</i> na ausência e presença do citral				
<i>C. albicans</i>	Controle	CIM	CIMx2	CIMx4
3B	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
3P	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
4B	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
4P	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
8B	Muitas estruturas unicelulares	Ausente	Ausente	Ausente
9B	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
9P	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
11B	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
11P	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente

...Continua

Tabela 3: Análise micromorfológica de *C.albicans* na ausência (controle) e presença do citral e nistatina.

<i>C.albicans</i> na ausência e presença do citral				
<i>C. albicans</i>	Controle	CIM	CIMx2	CIMx4
13B	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
13P	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
ATCC 76645	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente
Demais cepas	Muitas estruturas unicelulares	Ausente	Ausente	Ausente

***C. albicans* na ausência e presença da nistatina**

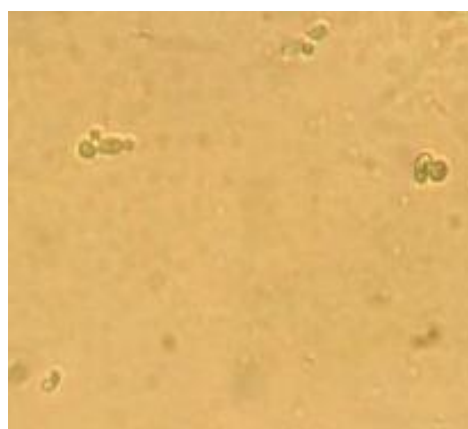
<i>C. albicans</i>	Controle	CIM	CIMx2	CIMx4
ATCC 76645	Muitas estruturas unicelulares	Raras leveduras	Ausente	Ausente

... Continuação

Figura 2: Micromorfologia de *C.albicans* na ausência (controle) e presença de citral. (a) *C.albicans* ATCC 76645 na ausência do produto, demonstrando estruturas como blastoconídeos e pseudohifas. (b) *C.albicans* ATCC 76645 na presença do fitoconstituente, observa-se raras leveduras e pseudohifas. (c) *C.albicans* LM-11P na ausência do citral exibindo grande quantidade de estruturas celulares, blastoconídeos e pseudohifas. (d) *C.albicans* LM-11P sob ação da CIM do citral, com raras leveduras e pseudohifas.



(a)



(b)



(c)

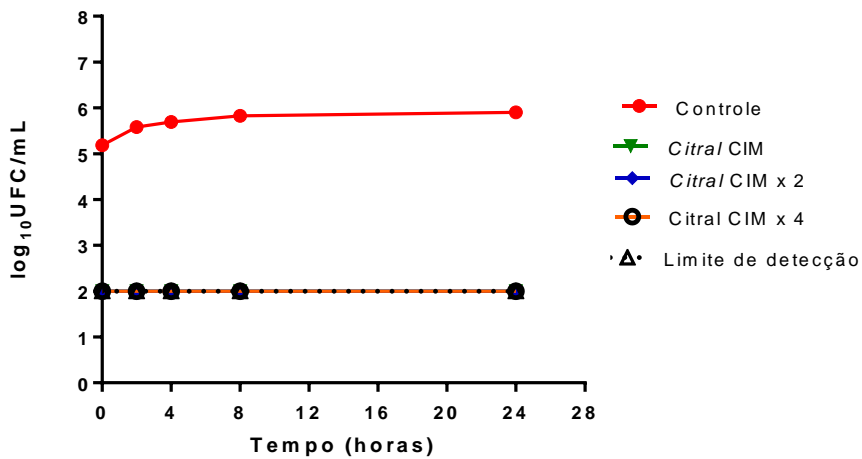


(d)

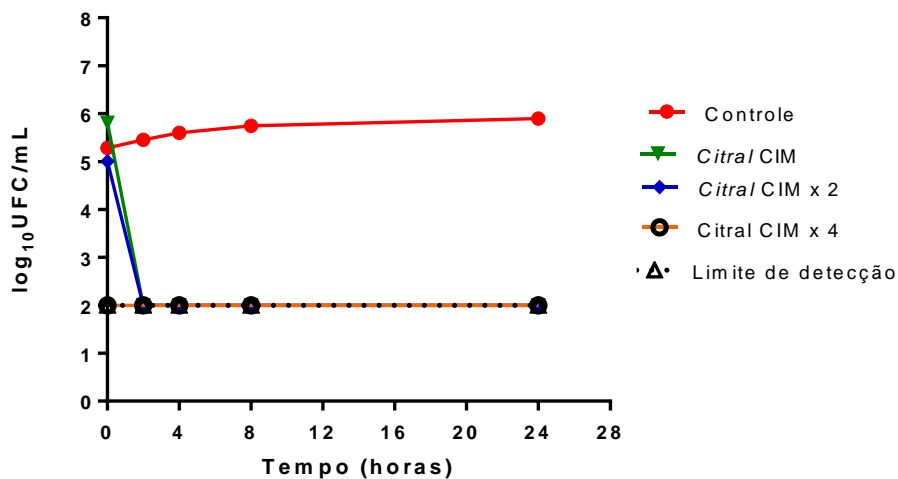
Os gráficos da Figura 3 mostram o \log_{10} UFC/mL em função do tempo de exposição à presença de citral para a *C.albicans* ATCC 76645, *C.albicans* LM-8B e o grupo controle (CIM, CIMx2 e CIMx4). Para a cepa padrão sob efeito do citral não houve crescimento em nenhum dos tempos para as concentrações

estudadas. A cepa clínica exposta ao produto apresentou redução do crescimento após o tempo de duas horas após o início do experimento na CIM e na CIMx2. A partir do tempo referente a 4 horas não se evidenciou nenhum crescimento fúngico.

Figura 3: (a) Curva tempo-morte para *C.albicans* ATCC 76645 quando exposta a várias concentrações do citral. (b) Curva tempo-morte para *C.albicans* LM-8B sob efeito de diferentes concentrações do citral.



(a)



(b)

A Tabela 4 exibe os resultados do ensaio de modulação realizado para verificar a ação do citral em concentração sub-inibitória (4 µg/mL) sobre a nistatina (1024 µg/mL). Observou-se que não houve efeito modulador do fitoconstituente sobre o medicamento licenciado, ou seja, o citral não interferiu na resistência das cepas de *C.albicans* frente à nistatina.

Tabela 4: Resultados do ensaio de modulação do citral sobre a nistatina para as cepas de *C.albicans*.

<i>C.albicans</i>	Citral/nistatina (µg/mL)									Controle das cepas	Controle do meio
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4		
3B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
11P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ATCC 76645	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ : crescimento do micro-organismo - : sem crescimento do micro-organismo

6. DISCUSSÃO

A estomatite associada a *Candida spp.* é uma doença infecciosa prevalente e seu tratamento tem se tornado difícil pela recorrência da doença e resistência das espécies dessa levedura aos antifúngicos utilizados^{27,36,39}.

Entre os produtos selecionados de acordo com citações na literatura por estudos etnobotânicos^{4,12,66}, o citral obteve melhor resposta antifúngica contra *C.albicans*, inibindo as cepas até uma concentração de 128 µg/mL.

Todas as leveduras foram resistentes ao óleo essencial de gengibre. O estudo de Sharifzadeh e Shokri⁵³ (2016) encontraram CIM do respectivo óleo correspondente a 2500 µg/mL para cepas de *C.albicans* resistentes e sensíveis ao fluconazol. Estudos como os de Aghazadeh *et al*^β (2016) verificaram concentrações inibitórias mínimas de 5 mg/mL referentes a extratos de gengibre. O óleo de orégano apresentou CIM de 256 µg/mL, na pesquisa dos autores Sharifzadeh e Shokri⁵³ (2016), a CIM encontrada foi de 300 µg/mL. O óleo essencial de menta e o fitoconstituente limoneno apresentaram CIM 256µg/mL. E o citral foi o que produziu melhor resposta antifúngica na seleção realizada, como pode ser visto na Tabela 1.

A atividade antifúngica do citral foi determinada na concentração de 32 µg/mL (CIM 90%). Este resultado aproximou-se com os obtidos por Leite *et al*^{β5} (2014) que apresentaram CIM de 64 µg/mL sobre cepas de *C.albicans* isoladas do sangue. No estudo de Lima *et al*^{β6} (2012) a concentração 512 µg/mL inibiu todas as leveduras de *C.albicans* isoladas do sangue, urina, trato respiratório e secreção vaginal, o que sugere maior resistência das cepas isoladas desses locais do que da cavidade bucal.

A CFM do citral coincidiu com a CIM em toda a amostra utilizada. De acordo com Siddiqui *et al*⁴⁹ (2010) a substância possui uma atividade fungistática quando a relação CFM/CIM ≥ 4 e fungicida quando CFM/CIM <4 . Para Hafidh *et al*²³ (2011) sendo essa relação 1:1 e 2:1, o produto é considerado fungicida, e fungistático quando a razão é maior que 2:1. De acordo com essas metodologias, o citral analisado no presente estudo demonstrou ter atividade fungicida.

Corroborando com estudos de Leite *et al*^{β5} (2014) que encontraram valores de CFM igual CIM (64 µg/mL) para todas as cepas analisadas. Sousa *et al*^{β9} (2016) verificaram valores de CFM entre 256 µg/mL e 1024 µg/mL (CFM₅₀ e CFM₉₀ respectivamente) referentes ao citral sobre *C. tropicalis* isoladas do sangue, resultando em atividade fungicida nas leveduras testadas.

As avaliações micromorfológicas (Tabela 3 e Figura 2) de *C. albicans* ATCC 76645 e LM-11P sob um microscópio óptico demonstraram para o controle presença de estruturas indicadoras de crescimento de fungos com pseudohifas e blastoconídeos. Na presença de citral observa-se raras estruturas, maior quantidade de blastoconídeos do que pseudohifas, alterando a morfologia das cepas.

De acordo com Alves *et al*^β (2013), alterações morfológicas estão associadas à patogenicidade dos micro-organismos, onde os fatores ambientais locais afetam o estado de fungo comensal, tornando-os infecciosos. A transição morfológica levedura-hifa é considerada relevante para a virulência de infecções fúngicas. Leite *et al*^{β5} (2014) também verificaram essas mudanças, as cepas de *C. albicans* apresentaram poucos blastoconídeos e ausência de pseudohifas na presença do citral. Destaca-se que esses resultados fornecem grande relevância para o desenvolvimento de um agente antifúngico.

O crescimento das leveduras foi analisado em função do tempo em concentrações diferentes do citral. Duas cepas de *C. albicans* foram submetidas à cinética de morte microbiana (Figura 3). O teste realiza uma contagem de células viáveis verificando a ação fungicida ou fungistática e avalia a interação do produto teste com o micro-organismo a fim de caracterizar uma relação dinâmica entre concentração e tempo de exposição²⁹.

Essa pesquisa demonstrou que para a cepa clínica houve redução no crescimento igual a 3 log₁₀UFC/mL em duas horas de exposição à CIM e CIMx2 do citral, classificando-se como produto fungicida de acordo com os critérios de Klepser *et al*^{β9} (1997). Não houve crescimento visível da cepa clínica em nenhum dos tempos observados quando exposta à CIMx4 do citral, assim como em nenhuma das concentrações do citral frente a cepa padrão. Esse comportamento revela uma dependência da concentração do citral com sua atividade fungicida.

Nas cepas de *C. albicans*, Leite *et al*⁶⁵ (2014), e Zore *et al*⁷² (2011) também observaram o efeito fungicida do citral pelo o método de cinética de morte. No primeiro estudo, o tempo necessário para atividade fungicida do citral foi de quatro horas para a CIM (64 µg/mL) e duas horas para a CIMx2. No segundo, foram necessárias duas horas para matar 99,9% do inóculo em uma concentração de 640 µg/mL.

Os possíveis mecanismos de ação do citral na célula fúngica ainda não foram totalmente elucidados na literatura. Park *et al*⁴⁶ (2009) observaram que o citral foi capaz de causar degeneração de hifas, separação da membrana da parede celular e a desintegração das mitocôndrias da espécie fúngica *Trichophyton mentagrophytes*. De acordo com Harris²⁴ (2002), o citral parece agir predominantemente na membrana celular fúngica, afetando sua estrutura e causando a morte celular, pois inibe a germinação de esporos, proliferação e respiração celular.

Lima *et al*⁶⁶ (2012) e Leite *et al*⁶⁵ (2014) concluíram em seus trabalhos que a CIM encontrada do citral não alterou a presença de sorbitol, sugerindo que ele não atua modificando a parede celular fúngica, e nem se liga ao ergosterol, afetando provavelmente outro alvo.

Todas as cepas foram resistentes à nistatina, assim não foi possível determinar a CIM supondo que esta seja maior que 1024 µg/mL, excetuando-se a *C. albicans* ATCC 76645, na qual foi sensível a uma concentração de 256 µg/mL.

Estudos verificando resistência de espécies de *Candida* são relatados na literatura como o de Souza *et al*⁶⁹ (2016) que observaram crescimento de todas as leveduras de *C. tropicalis* isoladas do sangue sob presença do fluconazol, à exceção da *C. tropicalis* ATCC 13803. Os autores destacam que esse medicamento é muito utilizado na prática clínica devido à sua eficácia e baixa toxicidade. Com essa frequente exposição, a resistência dos isolados de *Candida* e suas espécies tem se tornado comum.

Essa relação de exposição pode explicar também os resultados presentes nessa pesquisa, na qual o grande uso de nistatina ou medicamentos prescritos como antifúngicos na estomatite protética associada a *Candida* tem tornado as

cepas de *C.albicans* resistentes a esse medicamento^{27,36,39}. Interações microbianas presentes na cavidade bucal favorecem a proliferação dos micro-organismos, facilitando o aumento da resistência dessa espécie de *Candida*^{63,65}.

A resistência de cepas clínicas de *C.albicans* oriundas de usuários de próteses frente ao antifúngico padrão nistatina utilizada para o tratamento de estomatite protética associada a *Candida*, demonstra a importância de estudos que pesquisem a ação de produtos sobre essa espécie tão prevalente na prática clínica. Permitindo assim, a descoberta de novos agentes antifúngicos.

A levedura padrão ATCC 76645 demonstra possuir menor quantidade de estruturas fúngicas como pseudohifas e blastoconídeos em relação às cepas de origem clínica como pode ser observado na Figura 2 (a-c). Essa cepa não interage com outros micro-organismos, como a *C.albicans* clínica. Essa característica pode ter influenciado na sensibilidade da *C.albicans* ATCC 76645 à nistatina em contraste com as demais cepas clínicas, nas quais não houve potencial inibitório desse antifúngico resultando em crescimento nas concentrações estudadas.

A adição do citral no meio de crescimento em uma concentração subinibitória 4 µg/mL (CIM/8) não resultou na interferência da resistência das cepas clínicas e padrão frente à nistatina, se observando a proliferação de todas as leveduras (Tabela 4). Não há estudos na literatura que investigam a atividade moduladora do citral frente à nistatina.

O aumento da atividade antimicrobiana ou a reversão da resistência dos micro-organismos por componentes não convencionais, classifica esses compostos como modificadores da tal atividade¹³. O citral não foi classificado como modificador da atividade antifúngica da nistatina sobre a resistência das cepas estudadas.

Essa pesquisa apresenta limitações por se tratar de um estudo laboratorial. Considerando o aumento de infecções fúngicas e a grande prevalência de estomatite protética associada a *Candida spp.*, a busca de novas alternativas de tratamentos para essas patologias torna-se necessária. O citral se destacou nessa

pesquisa pelos bons resultados referentes aos testes utilizados frente a cepas clínicas de *C.albicans* isoladas de usuários de próteses.

7. CONCLUSÃO

Dentre os produtos naturais analisados, o citral produziu melhor resposta antifúngica. O citral demonstrou atividade fungicida frente às leveduras de *C. albicans* isoladas de usuários de próteses e sobre a cepa padrão. O fitoconstituente modificou morfológicamente as leveduras estudadas, observando raras estruturas unicelulares quando expostas ao citral.

Esse produto se destacou por possuir atividade de morte microbiana em duas horas de exposição referente a sua CIM e CIMx2 contra *C. albicans* clínica. Foi verificada a resistência de todas as cepas clínicas sobre a nistatina. O citral não interferiu na resistência das cepas sobre o medicamento licenciado.

O citral revelou ser um fitoconstituente promissor para futuras pesquisas que investiguem seu modo de ação na célula fúngica e potencial citotóxico para sua melhor compreensão, em vista do desenvolvimento de novos antifúngicos contra espécies de *Candida*.

REFERÊNCIAS*

1. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014; 69 (4): 396–407.
2. Alves LA, Freires IA, Pereira TM, Souza A, Lima EO, Castro RD. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4):965–971.
3. Aghazadeh M, Zahedi Bialvaei A, Aghazadeh M, et al. Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (in vitro study). *Jundishapur J Microb*. 2016; 9(2):e30167.
4. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacog*. 2008; 18(3):472-508.
5. Andrade MA, Cardoso MG, Batista LR, Mallet ACT, Machado SMF. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Rev Ciênc Agron*. 2012; 43(2):399-408.
6. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:446–475.
7. Bianchi CM, Bianchi HA, Tadano T, Paula CR, Hoffmann-Santos HD, Leite Jr. DP, Hahn RC. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop*. 2016; 58(17):01-05.
8. Cardoso J, Soares J. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105:1026–32.
9. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: A role for polyenes. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:457–65.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian VMD. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins; 1991: 739-788.
11. CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Protocol M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2. ed. Pennsylvania, USA: NCCLS, 2002.
12. Cordeiro JMP, Félix LP. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. Rev Bras Pl Med. 2014; 16(3 supl. I):685-692.
13. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy. 2008; 54: 328–330.
14. Cruz PC, Freitas KM, Peracini A, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Método químico versus método químicomecânico: comparação clínica na eficácia da remoção de biofilme da prótese total. Braz Oral Res. 2005; 19(1):99.
15. Dalmau LM. Remarques sur la technique mycologique. Ann Parasitol Hum Com. 1929; 7:536-545.
16. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations, In: Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: Williams & Wikins, 1991: 434–441.
17. Ellof JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med. 1998; 64(8):711-713.
18. Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 33(2):75-80.
19. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. J Clin Microbiol. 2002; 40(10):3776-3781.
20. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont. 2011; 20(4):251-260.

21. Gleiznys A, Zdanaviciene E, Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015; 17(2):54-66.
22. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal*. 2000; 11(3):137-147.
23. Hafidh RR, Abdulamir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*. 2011; 5:96–106.
24. Harris R. Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int J Aromat*. 2002; 12(2):83–91.
25. Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Central bureau voorschimm el cultures. Virgii: Universitant Rovira; 1995.
26. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol*. 2007; 110(3):391-400.
27. Iosif L, Preoteasa CT, Murariu-Maquireanu C, Preoteasa E. Clinical study on thermography, as modern investigation method for *Candida*-associated denture stomatitis. *Rom J Morphol Embryol*. 2016; 57(1):191-5.
28. Khan MSA, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2012; 50(1):33-42.
29. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997b; 41:1392–1395.
30. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal timekill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:1207–1212.
31. Konemam EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Scherckenberger PC, et al. Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDS; 2001: 551-588.
32. Kurtzmann CP, Fell JW. The yeast: a taxonomic study. 4. ed. New York: Elsevier; 1998.


33. Lakatos EM, Marconi MA. Fundamentos da Metodologia Científica. 7. ed. São Paulo: Atlas, 2010.
34. Leite DP, Piva MR, Martins-Filho PRS. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e a terapia fotodinâmica. Rev Odontol UNESP. 2015; 44(1):12-17.
35. Leite MCA, Bezerra APB, Sousa JP, Guerra FQS, Lima EO. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. Evid based complement alternat med. 2014: 1-9.
36. Lima IO, Nóbrega FM, Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, Diniz MFFM. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. Pharm Biol. 2012; 50(12):1536-1541.
37. Lodder I. The yeast: a taxonomic study. Amsterdam: Horth Helland Publishing; 1970.
38. Mangprayool T, Kupittayanant S, Chudapongse N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. Fitoterapia. 2013; 89:68–73.
39. Marcos-Arias CM, Eraso E, Madariaga L, Quindos G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11:119.
40. Martins CH, Pires RH, Cunha AO, Pereira CA, Singulani J de L, Abrão F, Moraes Td, Mendes-Giannini MJ. *Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. Fungal Biol. 2016; 120(4):530-7.
41. Monk BC, Goffeau A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. Sci. 2008; 321:367-9.
42. NCCLS, 2002. National committee for clinical laboratory standards – Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. Villanova, NCCLS 2002; 17: 09 (Document M27 –A2).
43. Newton AV. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. Rev Bras Patol Oral. 2003; 2(1):3.

44. Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17(3):466-476.
45. Paiva LCA, Ribeiro RA, Pereira JV, Oliveira NMC. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. *Rev Bras Farmacogn.* 2009; 19(2A):423-428.
46. Park MJ, Gwak KS, Yang I, Kim KW, Jeung EB, Chang JW, Choi IG. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia.* 2009; 80:290–296.
47. Peman J, Canton E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7:453–60.
48. Ramachandra S, Linde J, Brock M, Guthke R, Hube B, Brunke S. Regulatory networks controlling nitrogen sensing and uptake in *Candida albicans*. *PLoS One.* 2014; 9: e92734.
49. Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TNM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J Saudi Chem Society* 2013; 17: 237-243.
50. Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Agar G, et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 2004; 15(7):549-557.
51. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16(2):139-43.
52. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004; 35(4):275-280.
53. Sharifzadeh A, Shokri H. Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. *Avic J Phytomed.* 2016; 6(2):215-222.
54. Sharma N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res.* 2006; 163(3):337-44.

55. Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara; 2004.
56. Silva C de B, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. Braz J Infect Dis. 2008; 12(1):63-6.
57. Silva MAS, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(2):236-240.
58. Simoes CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6d. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC; 2007.
59. Sousa JP, Costa AOC, Leite MCA, Guerra FQS, Silva VA, Menezes CP, Pereira FO, Lima EO. Antifungal activity of citral by disruption of ergosterol biosynthesis in fluconazole resistant *Candida tropicalis*. IJTDH. 2016; 11(4):1-11.
60. Spitzer CMOSV. Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Editora da UFSC, 2004: 467- 495.
61. Thilakumara IP, Jayatilake JA, Pallegama RW, Ellepola AN. Denture-induced stomatitis and associated factors in a group of patients attending a university dental hospital in Sri Lanka. J Investig Clin Dent. 2017; 8(2):01-07.
62. Tiraschi IN, Carnovale S, Benetucci A, Fernández N, Kurlat I, Foccoli M, Lasala MB. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatologia. Rev Iberoam Micol. 2007; 24(4):263-267.
63. Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. Arch Oral Biol 1992; 37(8):613-22.
64. Vásquez SPF, Mendonça MS, Noda SN. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. Acta Amazonica. 2014; 44(4):457-472.

65. Verran J, Motteram KL. The effect of adherent oral streptococci on the subsequent adherence of *Candida albicans* to acrylic in vitro. *J Dent Bristol* 1987; 15(2):73-6.
66. Vieira DRP, Amaral FMM, Maciel MCG, Nascimento FRF, Libério AS. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em patógenos orais. *Rev Bras PI Med*. 2014; 16(1):135-167.
67. Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast*. 2012; 29:459–466.
68. Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, Lewis MA. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol*. 2013; 5(21): 22434.
69. Xia H, Liang W, Song Q, Chen X, Chen X, Hong J. The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. *Cytotechnol*. 2013;65:49–57.
70. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, Mcgraw K, Stoner L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2016; 25(4):288-301.
71. Zomorodian k, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir, Tarazooie KB, Vojdani M, *et al*. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Medical Mycology*. 2011; 49: 208–211.
72. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 2011; 18(13):1181–1190.

Anexo 1 – Certidão de aprovação do Comitê de Ética

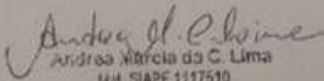


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 6ª Reunião realizada no dia 21/07/2016, o Projeto de pesquisa intitulado: **“SAÚDEARTE: TROCA DE SABERES E DIFUSÃO DA CIDADANIA”**, da pesquisadora Edeltrudes de Oliveira Lima. Prot. nº 0395/16. CAAE: 57435016.4.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andréia Márcia do C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba
Campus I – Cidade Universitária - 1º Andar - CEP 58051-900 – João Pessoa – PB
☎ (83) 3216 7791 – E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

Apêndice 1 - Carta de anuência (Comunidade Recantos do Poço)

Título do Projeto: **"PROJETO SAUDEARTE: Troca de saberes e difusão da cidadania"**.
Pesquisadora Responsável: **Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima.**

CARTA DE ANUÊNCIA

Pelo presente instrumento, Maria Cícera de Brito / CPF : 415.177.094 -15
da comunidade Recantos do Poço manifesta sua
anuência em participar da realização do projeto **PROJETO SAUDEARTE: Troca de saberes e
difusão da cidadania**, o qual será parte integrante da dissertação do mestrado em Odontologia pela
Universidade Federal da Paraíba dos mestrandos Julliana Cariry Palhano e José Klinderberg de
Oliveira Júnior. Esse trabalho tem como objetivo: propor, aplicar e conhecer a influência da arte no
padrão de educação-saúde e qualidade de vida de indivíduos pertinentes as comunidades com e sem
atividade cultural do município de João Pessoa-PB e/ou de outros, fomentando o desenvolvimento de
atividades educativas e trocas de saberes entre profissionais liberais, estudantes da área de saúde
da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e os integrantes das comunidades. Além de isolar,
identificar leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de indivíduos das comunidades incluídas
nesse projeto e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de produtos naturais sobre as cepas clínicas
isoladas.

A referida pesquisa tem como pesquisadora responsável a Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira
Lima. Telefone: (83) 98787-3357 e e-mail: edelolima@yahoo.com.br.

Os dados coletados e registrados ficarão à disposição das Instituições e responsáveis pela
pesquisa, sempre respeitando o caráter confidencial das informações registradas e o sigilo de
identificação dos participantes. Os dados serão arquivados pelos pesquisadores e, serão desativados
após o período de cinco (5) anos.

Eu declaro ter pleno conhecimento da pesquisa e a aceitação está
condicionada ao cumprimento dos pesquisadores aos requisitos da Resolução
466/2012 CNS/MS e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados e
materiais coletados exclusivamente para os fins de pesquisa, produção de trabalhos
de divulgação e publicação científicas.

Caldeota, 14 de maio de 2016.

Instituição/Comunidade/Grupo: Comunidade Recantos do Poço

Maria Cícera de Brito
Responsável/Representante

Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Projeto SAUDEARTE: troca de saberes e difusão da cidadania

Pesquisadores: Prof^ª. Dra. Edeltrudes de O. Lima, Prof. Dr. Ricardo D. de Castro, Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Este Projeto de Extensão e Pesquisa visa estudar e conhecer a influência da arte no padrão de educação-saúde e qualidade de vida de sujeitos pertinentes às comunidades com e sem atividade cultural dos municípios da grande João Pessoa e Cabedelo - PB, fomentando o desenvolvimento de atividades educativas e trocas de saberes entre profissionais liberais, estudantes da área de Saúde da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, do Ateliê Multicultural Elioenai Gomes e os integrantes das comunidades. Será estudado perfil dos sujeitos representativos das comunidades participantes; ministradas palestras educativas com tema de interesse em saúde; ministradas oficinas de Educação-Saúde; levantamento de dados sobre os conhecimentos e saberes artístico - cultural de cada comunidade; atividades lúdicas e coleta de material biológico da prótese e da boca do participante. Participarão da pesquisa indivíduos com idade superior a 18 anos e que aceitaram participar da pesquisa. As informações serão coletadas por meio de entrevistas com a aplicação de um questionário estruturado. Informamos que esta pesquisa oferece riscos mínimos a seus participantes, como constrangimento. Não possui nenhum meio de discriminação aos autores dos documentos envolvidos no estudo. Sua participação é voluntária, sendo garantido o direito de desistir da pesquisa, em qualquer tempo, sem que essa decisão o prejudique quanto aos aspectos éticos, morais, financeiros, sociais e de acesso à saúde. Todas as informações obtidas em relação a esse estudo permanecerão em sigilo, assegurando proteção de sua imagem e dos autores dos documentos envolvidos no estudo. Serão respeitados valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados dessa pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicações científicas, porém sua identidade não será divulgada nestas apresentações, nem serão utilizadas quaisquer imagens ou informações que permitam a sua identificação.

Esperando contar com o seu apoio, desde já agradecemos a sua colaboração.

Contato com o pesquisador responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora Edeltrudes de Oliveira Lima. Telefone: (83) 98737-3357/ (83) 3216-7026. Endereço: Rua Alcebiades da Cunha, N° 33, Bancários, CEP: 58051080. E-mail: edelolima@yahoo.com.br

Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB

Endereço: Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba - 1º andar / Campus I /Cidade Universitária /CEP: 58.051-900. Telefone: (83) 3216 7791. E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

AUTORIZAÇÃO

Após ter sido informado sobre a finalidade do projeto "**PROJETO SAUDEARTE: troca de saberes e difusão da cidadania**", **AUTORIZO** a utilização dos dados por mim fornecidos.

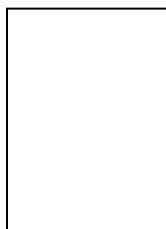
João Pessoa, _____ de _____ de 2016.

Assinatura do voluntário da pesquisa

Assinatura da Pesquisadora Responsável

Impressão Datiloscópica

(Edeltrudes de Oliveira Lima)



Apêndice 3 – Folheto de orientações

Cuidados com a prótese

Cuide bem de sua prótese, pois ela exerce várias funções, entre elas, a mastigação, a fala, deglutição, estética. A higienização tanto da prótese como da cavidade bucal é de extrema importância e evita diversas infecções que podem acometer a sua boca.

Consulte um dentista para avaliação e manutenção de sua prótese!

Como higienizar a prótese

- Utilize uma escova macia e sabonete neutro ou creme dental não abrasivo para escovação de todas as superfícies da prótese
- Enxague bastante com água
- Não se esqueça de higienizar a boca antes de colocar a prótese
- A prótese total ou removível deve ser retirada durante a noite para dormir, retire-a e coloque-a num recipiente com água

Lembre-se sempre de visitar o dentista!