



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

AMANDA SOARES COSTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE UMA ESPONJA
MARINHA (*Cinachyrella* sp.) SOBRE PATÓGENOS ORAIS**

**João Pessoa
2017**

AMANDA SOARES COSTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE UMA ESPONJA
MARINHA (*Cinachyrella* sp.) SOBRE PATÓGENOS ORAIS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de graduação
em odontologia, da universidade
federal da Paraíba em cumprimento
às exigências para conclusão.

Orientadora: Sabrina Garcia de Aquino, Pós- doutora

Co-orientador: Ricardo Dias de Castro, Doutor

João Pessoa

2017

C837a Costa, Amanda Soares.

Atividade antimicrobiana In Vitro de uma esponja marinha (cinachyrella sp.)
sobre patógenos orais / Amanda Soares Costa. - - João Pessoa, 2017.

48f.: il. -

Orientadora: Sabrina Garcia de Aquino.

Co-orientador :Ricardo Dias de Castro

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS, 2017.

1. Antimicrobianos. 2. Esponjas Marinhas . 3. Cinachyrella.

BS/CCS/UFPB


CDU: 616.31-002 (043.2)

AMANDA SOARES COSTA


**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE UMA ESPONJA
MARINHA (*Cinachyrella* sp.) SOBRE PATÓGENOS ORAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em odontologia, da universidade federal da Paraíba em cumprimento às exigências para conclusão.

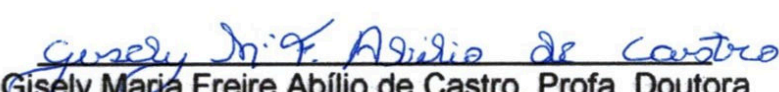
Trabalho de conclusão de curso aprovado em 01 / 06 / 2017



Sabrina Garcia de Aquino, Profa. Pós Doutora
Orientadora – UFPB



André Ulisses Dantas Batista, Prof. Doutor
Examinador – UFPB



Gisely Maria Freire Abílio de Castro, Profa. Doutora
Examinador – UFPB

Dedico,

A minha mãe, Neuraide Ramos Soares,
por ser o alicerce da minha vida, pelo
amor incondicional, por ter acreditado em
mim, por me ensinar o valor dos sonhos,
da honestidade e da perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu mais fiel e profundo agradecimento. Pela saúde, coragem e determinação para a realização dos meus sonhos. Por ser o meu sustento, o meu caminho e por me permitir sentir o Seu imenso amor dia a dia. Agradeço por todas as bênçãos generosamente dadas a mim, sem a Sua presença não existiria vida em mim. Agradeço, Deus, por ser o meu descanso e refúgio em momentos difíceis, e por me mostrar que esses, nada mais são do que matéria prima para o aprendizado, maturidade e fortalecimento da minha fé.

A minha amada mãe, àquela a quem dedico todas as minhas conquistas. Agradeço pelo amor profundo, por acreditar em mim e nos meus sonhos, pelos valores ensinados em atitudes, pelos conselhos sábios, por me mostrar que quando honramos a Deus em atitudes e de coração, Ele sempre nos honrará em retribuição. À senhora é o meu maior amor aqui na terra, é a minha luz.

A meu irmão, que me permitiu sentir um amor inexplicável, o presente de Deus para nós. O menino mais amado, lindo e inteligente, por quem tenho profundo zelo. Você é nossa bênção.

Aos meus avôs maternos, pela extensão de tanto amor e companheirismo. O meu respeito e admiração por vocês serão eternos. Agradeço por nos mostrar que não há nada mais próximo de Deus que à família.

Aos amigos que ganhei ao longo do curso. A amizade de vocês é muito importante para mim, foi fundamental todos os dias ao longo desses anos. Que o Senhor os abençoe.

A professora Sabrina, por ter me acolhido e orientado tão pacientemente. Agradeço pelo empenho e dedicação para a realização deste trabalho. Muito do que aprendi em Periodontia e na realização deste trabalho, devo a senhora. Certamente, a senhora é um espelho para mim e para muitos.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste estudo. A dra. Gisely, por ter nos cedido a esponja, ao professor Ricardo Castro por todo o apoio e a Rebeca e Marianne, por toda a ajuda nos experimentos.

A todos, o meu muito obrigada!

“ Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

As infecções bucais mais comuns são a cárie dentária, a doença periodontal e a candidíase. Atualmente, no mercado, estão disponíveis produtos farmacologicamente ativos para combater os microrganismos causadores dessas patologias, no entanto, o aumento da resistência microbiana e os efeitos colaterais indesejáveis, faz crescer a busca por produtos de origem natural. O ambiente marinho representa uma enorme e ainda inexplorada fonte de produtos naturais, com grande diversidade estrutural e farmacológica. Estudos voltados a essa biodiversidade, verificaram que o representante com a maior fonte de moléculas com potencial bioativo são as esponjas marinhas. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato bruto etanólico (EtOH), hidroalcóolica e clorofórmio (CHCl₃) da esponja marinha *Cinachyrella* sp. sobre patógenos orais. A concentração mínima inibitória (CIM) foi avaliada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços e as concentrações fungicida mínima (CFM) e bactericida mínima (CBM) por semeadura do subcultivo, sendo a nistatina e a clorexidina utilizadas como controles positivos. Essa espécie exibiu um potencial antifúngico satisfatório em cepas de *Candida albicans* CBS 562, *Candida tropicalis* CBS 93 e *Candida Krusei* CBS 593 e sobre a cepa bacteriana de *Streptococcus sanguinis*, com destaque para a fase CHCl₃, com CIM de 125 µL em *S. sanguinis*, 156,25 µL em *C. tropicalis* e *C. krusei* e 312.5 µL em *C. albicans*. Este estudo indica que as esponjas são uma fonte em potencial para novos compostos antimicrobianos, entretanto mais estudos *in vitro* devem ser empregados, inclusive em modelos de biofilme, que mimetizem as condições da microbiota *in vivo*.

Palavras-chave: Antimicrobianos, Esponjas marinhas, *Cinachyrella*.

ABSTRACT

The most common oral infections are dental caries, periodontal disease and candidiasis. Currently, pharmacologically active products are available in the market to combat the microorganisms that cause these pathologies; however, the increase in microbial resistance and undesirable side effects, makes the search for products of natural origin grow. The marine environment represents an enormous and still unexplored source of natural products, with a high structural and pharmacological diversity. Studies on this biodiversity have verified that the representative with the largest source of molecules with bioactive potential are the marine sponges. In this way, the present study aimed to evaluate the in vitro antimicrobial effect of the crude ethanolic (EtOH), hydroalcoholic and chloroform (CHCl₃) extract of the *Cinachyrella* sp. on oral pathogens. The minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated by the microdilution technique in 96-well plates and the minimum fungicidal (CFM) and minimal bactericidal (MBC) concentrations by sowing the subculture, with nystatin and chlorhexidine being used as positive controls. This species exhibited a satisfactory antifungal potential in strains of *Candida albicans* CBS 562, *Candida tropicalis* CBS 93 and *Candida Krusei* CBS 593 and on the bacterial strain of *Streptococcus sanguinis*, with emphasis on the CHCl₃ phase, with MIC of 125 µL in *S. sanguinis*, 156.25 µL in *C. tropicalis* and *C. krusei* and 312.5 µL in *C. albicans*. This study indicates that sponges are a potential source for new antimicrobial compounds, however more in vitro studies should be employed, including in biofilm models, that mimic microbiota conditions in vivo.

Keywords: Antimicrobials, Marine sponges, *Cinachyrella*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus Celsius
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CCP	Cloreto de Cetilpiridíneo
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CHCl₃	Clorofórmio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Saboraud Dextrose
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DP	Doença Periodontal
EtOH	Etanol
h	Horas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PECS	Polímeros de Carboidratos Extracelular
PICS	Polímeros de Carboidratos Intracelular
TCT	2,3,5, Cloreto de trifenil tetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VS.	Versos

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e fases hidroacóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida albicans* CBS 562; *Candida. tropicalis* CBS 94 e *Candida krusei* CBS 593.32
- Tabela 2.** Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e fases hidroalcolóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida albicans* CBS 562.32
- Tabela 3.** Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e fases hidroalcolóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida tropicalis* CBS 94.33
- Tabela 4.** Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e fases hidroalcolóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida krusei* CBS 593.33
- Tabela 5.** Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e fases hidroacóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para clorexidina frente ao *Streptococcus sanguinis*; *Streptococcus oralis* e *Enterococcus faecalis*.34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1.	O biofilme supragengival e infecções orais de origem bacteriana	15
2.2.	Infecções orais de origem fúngica: a candidíase	17
2.3.	Agentes químicos de controle bacteriano disponíveis no mercado	20
2.4.	Produtos naturais	21
3.	OBJETIVOS	27
3.1.	Objetivo Geral	27
3.2.	Objetivos Específicos	27
4.	MATERIAS E MÉTODOS	28
4.1.	Esponja marinha (<i>Cinachyrella</i> sp.)	28
4.2.	Local de realização da pesquisa	28
4.3.	Microrganismos	28
4.3.1.	Cepas fúngicas	28
4.3.2.	Cepas bacterianas	28
4.4.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	29
4.5.	Ensaio de microdiluição	29
4.6.	Determinação das Concentrações Fungicida (CFM) e Bactericida Mínima (CBM)	30
5.	RESULTADOS	31
5.1.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	31
5.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	33
6.	DISCUSSÃO	35
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
8.	REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O desafio microbiano é uma realidade constante no ambiente bucal. Isso porque, apesar de estéril ao nascimento, a cavidade bucal é imediatamente colonizada por microrganismos do trato genital materno (DINIZ et al., 2012). Assim, entre seis a dez horas após o parto, inicia-se a colonização por microrganismos pioneiros, do gênero *Streptococcus* e no terceiro mês de vida a cavidade bucal possui uma microbiota formada principalmente por *Streptococcus salivarius*, *Veillonella alcalescens* e *Candida albicans*. Entretanto, a erupção dos elementos dentários, marca o início da colonização por *Streptococcus sanguis* e o *Streptococcus mutans*. Todavia, o desequilíbrio no ecossistema oral pode provocar a predominância de bactérias potencialmente patogênicas (PEREIRA et al., 2010; DINIZ et al., 2012).

Entre as patologias infecciosas mais comuns da cavidade bucal se destaca a cárie dentária, que é uma doença progressiva, caracterizada pela destruição de tecido dentário quando em meio ácido e sua patogenicidade está diretamente relacionada ao metabolismo microbiano altamente fermentativo, destacando-se o *S. mutans* junto ao *Lactobacillus* spp. no início do processo cariioso em esmalte e a participação do *Actinomyces* spp. quando a desmineralização alcança a dentina (JARDIM; MERINO; CAMPOS, 2015).

A segunda patologia oral que mais acomete a população humana é a doença periodontal (DP), que é uma infecção polimicrobiana de caráter inflamatório crônico, cuja patogenicidade é marcada pelo predomínio de bactérias anaeróbias Gram-negativas (CARRANZA et al., 2009). É uma doença sitio-específica, caracterizada por períodos de exacerbação e remissão, sendo a maior parte da destruição tecidual resultante da desequilibrada resposta inflamatória e imune do hospedeiro à invasão bacteriana e seus produtos. A forma como essa doença se manifesta clinicamente e a sua progressão dependem do equilíbrio entre agressividade dos microrganismos e a capacidade do hospedeiro em responder a essa agressão (ALMEIDA et al., 2006). Quando há um desequilíbrio nesse processo saúde-doença, os microrganismos periodontopatogênicos passam de uma organização comensal para uma relação de aproveitamento do hospedeiro (DINIZ et al., 2012).

Além das infecções bacterianas, a cavidade oral também é acometida por infecções oportunistas de origem fúngica. Dentre estas, a que mais acomete a cavidade oral é a candidíase, desordem causada por levedura do gênero *Candida*, com destaque para a *C. albicans* que, em indivíduos sadios, vivem de forma organicamente integrada (NEVILLE et al., 2009). No entanto, a partir do surgimento de fatores predisponentes que alterem a homeostase local, a conformação leveduriforme da *C. albicans*, considerada inócua, é modificada para uma forma fusiforme e patogênica, que está associada à invasão tecidual do hospedeiro (ALVES et al., 2006). O estado imunológico do hospedeiro (especialmente em quadros de imunossupressão), o ambiente da mucosa oral e a presença da cepa *C. albicans* são os principais fatores gerais que irão determinar manifestação clínica da candidíase (NEVILLE et al., 2009).

A candidíase oral, assim como a DP, é uma condição comumente observada em pacientes de UTI (Unidade de Terapia Intensiva) que se encontram entubados e diante da dificuldade de higienização oral, a microbiota bacteriana Gram-negativa e fúngica aumentam quantitativamente, havendo risco de disseminação sistêmica, podendo inclusive, levar o paciente a óbito (BAEDER et al., 2012; PEDREIRA, KUSAHARA, CARVALHO, 2009; PAULA et al., 2007). Neste contexto, e, em outras situações de dificuldade de controle mecânico do biofilme, o uso de agentes antimicrobianos como coadjuvante à terapia convencional pode ser interessante para se restabelecer o equilíbrio entre desafio microbiano e resposta do hospedeiro.

Atualmente no mercado existem diversos veículos para agentes antimicrobianos e o profissional deve levar em consideração a necessidade de cada paciente para a sua indicação. Os mais utilizados são os dentifrícios, colutórios, géis, vernizes, gomas de mascar e pastilhas. No entanto, os colutórios oferecem a vantagem de permanecerem ativos por um período maior de tempo, além de atingirem todas as faces do dente e tecidos moles (BAUROTH et al., 2003; GALLITSCHKE et al., 2004).

Entre os enxaguatórios bucais mais utilizados, estão os que apresentam em sua composição o cloreto de cetilpiridínio, triclosan, óleos essenciais (timol, eucaliptol, mentol, fenol, salicilato de metila) e a clorexidina (BUGNO et al., 2007; MARINHO, ARAUJO, 2007; MOREIRA et al., 2009). A clorexidina é considerada padrão ouro em relação aos outros agentes químicos comercializados,

apresentando amplo espectro de ação e efeito farmacológico inibidor de biofilme. É importante mencionar que a clorexidina tem como principal vantagem e característica, uma alta substantividade, ou seja, capacidade de se adsorver aos tecidos bucais e permanecer ativa por até 12 horas na cavidade oral (SEMENOFF, SEMENOFF-SEGUNDO, BIASOLLI, 2008). Entretanto, seus efeitos adversos, como a alteração de paladar, sabor desagradável e surgimento de manchas, limitam seu uso a períodos curtos e situações limitadas (TORRES et al., 2011). Dessa forma, observa-se a necessidade da busca por um agente químico que apresente uma eficácia antimicrobiana comprovada, mas com menores efeitos adversos.

Considerando as limitações dos agentes químicos disponíveis para o tratamento de infecções, nos últimos anos o uso de produtos naturais tem ganhado lugar de destaque na medicina em todo mundo, tendo mostrado eficácia nos resultados e redução dos efeitos colaterais em relação aos produtos convencionais (BUCHAL, 2001). No Brasil, desde o ano 2000 o uso de fitoterápicos é regulado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e desde 1976 a OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece o seu potencial e vem incentivando estudos nesta área (RESOLUÇÃO WHA 30.49).

Na odontologia o estudo de compostos e extratos de produtos naturais tem aumentado amplamente com o objetivo de se obter um agente antimicrobiano que possibilite a prevenção e tratamento das doenças bucais com o máximo de efetividade e mínima agressão ao organismo, com enfoque no biofilme dental (FREIRES et al., 2015).

Além disso, como parte da busca por produtos naturais que possam atuar como potenciais agentes antimicrobianos ou anti-inflamatórios, a biodiversidade marinha tem sido cada vez mais estudada em virtude do seu grande potencial genético e bioquímico (BLUNT et al., 2017; SHADY et al., 2017). Neste contexto, certas esponjas marinhas, as quais são grupos de animais multicelulares primitivos, simples, mas com estrutura morfológica complexa e diversificada, vêm se destacando para fins de obtenção de uma variedade de produtos naturais, tendo em vista as suas características biológicas, entre elas a presença de metabolitos secundários com propriedades antibacterianas, que os fazem candidatos interessantes para a pesquisa farmacológica e clínica (OZINGA, 2003; DUQUE et al., 2003). Dentre estas, as esponjas do gênero *Cinachyrella* apresentam em sua

constituição alcalóides, esteroides insaturados e triterpenos pentacíclicos, que conferem uma ação antimicrobiana contra bactérias e fungos. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana *in vitro* de uma esponja marinha da espécie *Cinachyrella* sp. sobre patógenos orais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A cavidade oral é um sistema microbiano aberto, em que bactérias são continuamente introduzidas e removidas deste sistema e nele irão se estabelecer aqueles microrganismos que possuem maior capacidade de aderência ou os que ficaram retidos na cavidade bucal. A superfície dos dentes é onde o biofilme bacteriano se estabelece preferencialmente, no entanto, no sulco gengival, dorso da língua e mucosa jugal e palatina, também se formam ecossistemas microbianos (DINIZ, 2012).

A maior parte das patologias que afetam a cavidade bucal apresenta alguma relação com agentes infecciosos e a microbiota residente bucal representa uma importante função na resistência inespecífica do hospedeiro diante de patógenos exógenos. Entretanto, em situações de desequilíbrio e inadequação do meio e do sistema imunológico, a microbiota pode se tornar patogênica e favorecer o aparecimento de condições clínicas patológicas, entre as principais, a cárie dental, a doença periodontal e a candidíase (FOSCHI et al., 2006).

Aproximadamente 700 diferentes tipos de espécies de microrganismos podem ser identificados na cavidade bucal, sendo metade destes colonizadores do tecido periodontal e o restante aderidos a outras estruturas, como a língua, mucosas e superfície dental (PASTER et al., 2006). Essa variação de microrganismos é diferenciada nos indivíduos de acordo com o processo saúde vs. doença e por fatores como idade, dieta, hormônios, fluxo salivar, higiene, hábitos e a resposta imune do hospedeiro ao desafio microbiano (DINIZ, 2012).

2.1. O biofilme supragengival e infecções orais de origem bacteriana

A cavidade oral representa uma das mais diversas e complexas comunidades microbianas do organismo humano, tornando-se o maior reservatório de microrganismos. Aderidos ao elemento dentário, estão microrganismos estruturalmente organizados em uma co-agregação, levando a formação de uma comunidade complexa chamada de biofilme. Nesta comunidade, entre as bactérias,

é possível a transferência de genes associados a virulência microbiana e à resistência a antimicrobianos, nessas situações, a defesa do hospedeiro terá eficácia limitada (JARDIM; MERINO; CAMPOS, 2015).

A adesão de bactérias ao elemento dentário é possível devido ao revestimento do dente por uma película adquirida, formada por glicoproteínas salivares. Inicialmente a adesão ocorre por cocos e bacilos Gram-positivos, principalmente *S. sanguis*. Após a colonização primária dá-se início à fase de coagregação, com o acúmulo de microrganismos com capacidade de adesão entre si e com proteínas da matriz extracelular do biofilme, o que favorece a maturação e o estabelecimento do biofilme supragengival, sacarolítico. (PEREIRA et al., 2010). Dessa forma, em um ambiente oral com higiene deficiente, associado a uma dieta cariogênica (rica em sacarose), qualquer bactéria é capaz de transformar açúcar em ácido, contudo, as espécies *S. mutans* e *Lactobacillus* são indubitavelmente as mais eficazes nesta função, tendo em vista as suas características de serem acidúricas e acidogênicas, tornando-as as principais responsáveis no processo de formação do biofilme supra gengival e no desenvolvimento da cárie (CARRETO et al., 2007).

A cárie dentária é considerada um problema de saúde pública e encontra-se entre as patologias mais prevalentes na população mundial, sendo responsável por enormes perdas dentárias, podendo ser minimizada por programas de prevenção e controle (REIS; MELO, 2003). É caracterizada como um processo crônico, após a interação de fatores como susceptibilidade do dente, microrganismos e dieta, ao longo de um determinado tempo (LIMA, 2007).

Assim, na presença de uma higiene oral deficiente, associada a modificações severas na dieta, com redução de ingestão de alimentos fibrosos (capazes de colaborar com a autolimpeza da cavidade bucal) e aumento no consumo de carboidratos fermentáveis e açúcares, a população de bactérias no biofilme se modifica e se multiplica, favorecendo o início do processo cariioso, com destaque para os *S. mutans* nesse processo. Isso porque, além da capacidade de colonizar precocemente a superfície dental, os *S. mutans* são altamente cariogênicos na medida em que sintetizam grandes quantidades de polímeros de carboidratos extracelulares (PECS) e intracelulares (PICS), que permitem a estabilização da adesão bacteriana e funcionam ainda como fontes de reservas nutritivas (HAMADA et al., 1984). O resultado desse processo é a desmineralização do esmalte, e a

seguir, da dentina, pelos ácidos produzidos pelos microrganismos durante o metabolismo dos carboidratos da dieta. O processo inicial de desmineralização do esmalte é normalmente seguido pela remineralização e a cavitação ocorre quando os períodos de desmineralização são maiores que os períodos de remineralização (SAMARANAYAKE, 2013).

Por outro lado, quando o acúmulo de biofilme microbiano à margem gengival não é acompanhado de uma dieta cariogênica, a formação de um biofilme periodontopatogênico é favorecida como resultado da quebra do equilíbrio na relação microbiota-hospedeiro, podendo dar início a uma reação imuno-inflamatória aguda restrita ao tecido periodontal de proteção, ou seja, um quadro de gengivite (JARDIM; MERINO; CAMPOS, 2015). A gengivite é a forma mais comumente encontrada entre os pacientes com doença gengival e é caracterizada pela hiperemia, edema, recessão e sangramento gengival; se não tratada devidamente ou, dependendo da susceptibilidade individual do hospedeiro, a gengivite pode ou não se cronificar ou evoluir para os tecidos de sustentação, promovendo perda óssea e de inserção com a formação de bolsas e estabelecimento da periodontite (ALVES et al., 2007).

Apesar dos conhecimentos sobre a organização dos microrganismos em um biofilme, seja este com um potencial cariogênico ou periodontopatogênico, não existe um consenso em relação a um tratamento universalmente eficaz contra essas estruturas organizadas. A terapia mais adequada para estas infecções vinculadas ao biofilme seria a sua remoção ou desorganização, seja por métodos mecânicos ou por controle químico (MUFFLER et al., 2013). Em pessoas com restrições de coordenação motora, os agentes farmacológicos aplicados localmente, se tornam uma opção interessante (LEMOS; KATZ, 2012).

2.2. Infecções orais de origem fúngica: a candidíase

A cavidade bucal também pode ser acometida por infecções de origem fúngica. Entre estas, a candidíase mais comum em humanos e quase sempre secundária a algum outro fator local ou sistêmico, tais como o uso de próteses dentárias, deficiências nutricionais, doenças metabólicas, a queda da imunidade do

hospedeiro, lesões em mucosas, higiene bucal deficiente e tratamentos prolongados com antibióticos e corticosteroides (DINIZ et al., 2010).

C. albicans tem como característica o seu dimorfismo, acreditando-se que a forma leveduriforme seja inofensiva e a forma de hifas esteja associada à invasão tecidual do hospedeiro (MELO; GUERRA, 2014). A presença do microrganismo na cavidade oral, não significa que haverá o aparecimento das características clínicas da doença, que ocorre com aproximadamente 30% a 50% da população. Isso porque é preciso haver um desequilíbrio ambiental proporcionado pelo estado imunológico desfavorável do paciente, uso recorrente de antibióticos, proporcionando um ambiente mais favorável ao desenvolvimento fúngico (ROSSI et al., 2011).

Os pacientes mais acometidos por esta infecção são os imunossuprimidos. Contudo, pessoas saudáveis também podem ser acometidas como resultado da interação desequilibrada entre hospedeiro e microrganismo, podendo variar de leve envolvimento superficial da mucosa até as formas mais disseminadas, as quais são mais observadas em pacientes sistematicamente comprometidos (HESPANHOI et al., 2010) Neste grupo de pacientes observa-se maior acometimento em crianças e idosos em uma frequência de 5% dos recém nascidos, 5% de pessoas com neoplasias e 10% dos pacientes idosos com condições de saúde frágeis (POWDERLY, ROBINSON, 1993; REGEZI, SCIUBBA, 2008).

Clinicamente, a candidíase oral pode ser manifestar de quatro diferentes formas, sendo estas: pseudomebranosa, eritematosa crônica, hiperplásica e mucocutânea (PEIXOTO et al., 2014). A pseudomembranosa, também chamada de sapinho, é a mais bem reconhecida e caracteriza-se pela presença de placas esbranquiçadas aderidas na mucosa que podem ser removidas através da raspagem, estando a mucosa subjacente avermelhada ou normal. Na forma crônica hiperplásica há a presença de placas esbranquiçadas, porém, não removíveis à raspagem, apresentando um aspecto clínico semelhante a condição mucocutânea, no entanto, com um acometimento imunológico mais grave. Na condição eritematosa, os pacientes relatam a sensação de queimação na boca, acompanhada da perda difusa das papilas filiformes da superfície dorsal da língua, resultando em aparência vermelha da mesma (NEVILLE et al., 2009).

Estão disponíveis no mercado alguns antifúngicos que são amplamente utilizados para o tratamento de candidíase, sendo representados pelos agentes azólicos, principalmente o fluconazol e itraconazol, e poliênicos, representados pela nistatina, anfotericina B e outros, sendo este último mais utilizado em infecções generalizadas (candidemia) por via parenteral e em ambiente hospitalar devido à sua toxicidade (AKPAN, MORGAN, 2002; ZARDO, MEZZARI, 2004).

No entanto, estes antifúngicos disponíveis no mercado, em sua maioria, apresentam restrições quanto a sua utilização, causando reações indesejadas nos usuários, aumento da resistência dos microrganismos aos fármacos, causados pelo uso excessivo de antimicrobianos sintéticos, ocasionando recidivas frequentes. Em vista dessas circunstâncias, frequentemente pesquisas tem sido realizadas em busca de uma substância antimicrobiana, oriunda de fontes alternativas, principalmente provenientes da flora (ABILIO et al., 2014).

O aparecimento da candidíase é comum em pacientes submetidos a tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço, tendo em vista que após a exposição à radiação ionizante há uma atrofia e degeneração da porção secretora da glândula provocando um quadro de hipossalivação, que por sua vez gera um sintoma conhecido por xerostomia (GARG; MALO, 1997). Em estudo realizado por Bonan et al., (2007), foi verificado previamente ao início do tratamento radioterápico de cabeça e pescoço, que os pacientes apresentaram elevada positividade para *Candida*. Ao término do tratamento a colonização aumentou, devido à redução do fluxo salivar, e houve predominância das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*, bem como diversificação das demais espécies.

Pacientes imunossuprimidos e hospitalizados apresentam maior prevalência de candidíase oral e doença periodontal em razão das alterações sistêmicas e locais, que contribuem para a alteração da flora bacteriana (TRENTIN et al., 2010; MEURMAM, HAMAIINEN, 2006). A terapia medicamentosa intensiva e prolongada, associada às alterações sistêmicas, diminui a imunidade do paciente e desequilibra a flora bacteriana normal, favorecendo o aparecimento de infecções orais. Aliado a isso estão às mudanças de hábitos durante o período de internação, o estresse e a deficiência na higiene oral, também são fatores que contribuem para o aparecimento de infecções, como a candidíase (STRAMANDINOLI et al., 2006). O controle efetivo do biofilme da cavidade bucal pacientes críticos e graves é essencial para diminuir o

risco de surgimento de infecções oportunistas, assim como o tempo de permanência no leito, racionalizando o uso de antibióticos (AMIB, 2013). A falta de profissionais da odontologia neste setor e o desconhecimento a respeito das patologias orais e dos procedimentos a serem realizados, são algumas razões apresentadas pela equipe atuante para justificar o déficit de higiene oral nos pacientes em unidades de terapia intensiva, associada ainda as limitações físicas destes pacientes (SOUZA; GUIMARÃES; FERREIRA, 2012). O tratamento atualmente realizado com antifúngicos e soluções químicas para bochecho apresentam limitações que justificam a busca por tratamentos alternativos com o uso de produtos naturais na tentativa de minimizar esses efeitos indesejáveis. Dentre os agentes químicos disponíveis no mercado, a clorexidina tem sido a mais utilizada, mostrando resultados positivos; no entanto, os efeitos adversos contraindicam o seu uso por tempo prolongado. (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009).

2.3. Agentes químicos de controle bacteriano disponíveis no mercado

Diversos agentes químicos para controle do biofilme supragengival estão disponíveis no mercado, cada um com suas especificidades e limitações, incluindo-se: a clorexidina, o cloreto de cetilpiridíneo (CCP), triclosan e óleos essenciais (BUSSADORI, 2013).

Entre os agentes catiônicos, destacam-se a clorexidina e o CCP, ambos com mecanismo de ação semelhantes. A atividade antimicrobiana da clorexidina se dá pela atração entre a molécula catiônica da clorexidina e a carga aniônica da superfície bacteriana, processo em que partículas da clorexidina ficam retidas à membrana celular bacteriana através de interações eletrostáticas, ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio, sendo uma adsorção à membrana dependente da concentração. Em doses elevadas, ela causa a morte bacteriana através da precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e em doses baixas, ocorre alteração na integridade da membrana celular (WATANABE et al, 2011; ROLLA, MELSEN, 1975). Entretanto, sua alta substantividade é que torna a clorexidina o agente químico de escolha para os tratamentos de curta duração, ou seja, sua capacidade de permanecer adsorvida em sua forma ativa por até 12 horas na

cavidade bucal, tornando-a o padrão ouro entre os agentes químicos usados na odontologia. A sua forma dicatiônica é o que proporciona esta característica, ou seja, uma das suas extremidades catiônicas se fixa a película, com carga negativa, e a outra extremidade fica livre para interagir com as bactérias, exercendo assim uma ação bactericida e bacteriostática (ZANATTA; ROSING, 2007).

De forma semelhante, o CCP provoca o aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana, provocando a sua lise e reduzindo a capacidade do microrganismo de aderir a superfície dentária. Porém, a sua eficácia clínica é reduzida devido à baixa substantividade (GRANJEIRO et al., 1993; MARINHO, ARAUJO, 2007; MOREIRA et al., 2009; SEMENOFF, SEMENOFF-SEGUNDO, BIASOLLI, 2008). Carências na substantividade também são observadas nos óleos essenciais e no agente químico triclosan, um agente não iônico, sendo comum associa-lo com outros compostos com a finalidade de aumentar a sua permanência na cavidade oral e conseqüentemente a sua eficácia (PIRES, ROSSA-JUNIOR, PIZZOLITTO, 2007; SEGUNDO et al., 2007).

Apesar de ser considerada o padrão ouro, a clorexidina apresenta potenciais efeitos colaterais no uso prolongado, que racionalizam o seu uso, destacando-se a alteração de paladar, sabor desagradável na boca, surgimento de manchas no dentes, próteses e língua, irritabilidade da mucosa lesionada, precipitação do cálculo supragengival e descamação da mucosa oral (GUIMARAES et al., 2006; TORRES, 2011; ZANATTA, ROSING, 2007). No entanto, efeitos adversos não são exclusivos da clorexidina, os óleos essenciais e o CCP provocam sensação queimação e gosto amargo na boca, este último ainda provoca o aumentado da formação de cálculo e a formação de manchas extrínsecas no dente pela interação com corantes dos alimentos (GRANJEIRO et al., 1993; SHEEN, OWENS, ADDY, 2001).

As limitações dos agentes químicos disponíveis para o tratamento de infecções orais justificam a busca por meios terapêuticos alternativos que apresentem eficácia e especificidade sobre os microrganismos envolvidos, buscando reduzir os efeitos adversos e preservando o equilíbrio da microbiota bucal.

2.4. Produtos Naturais

O Brasil apresenta a maior biodiversidade vegetal do mundo e é uma fonte em potencial de moléculas bioativas ainda desconhecidas, além de possuir tecnologia para validar cientificamente este conhecimento, tornando-se assim um grande contribuinte para o desenvolvimento da Fitoterapia aplicada à Odontologia (OLIVEIRA et., 2007).

Os produtos naturais atualmente representam uma alternativa de terapia mais econômica, aliada à sua eficácia e facilidade de uso, comparado com as formas oferecidas pela indústria farmacêutica. Nesse contexto, o aumento no uso destes produtos tem se mostrado de grande importância, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (FREIRES et al., 2010). Extrato de plantas, óleos essenciais e fitoconstituintes podem ser utilizados em produtos para terapias preventivas ou curativas de patologias orais (PALOMBO, 2011).

O ambiente terrestre sempre foi o foco principal para a descoberta de novas substâncias com propriedades farmacológicas, sendo a fonte de diversos produtos naturais com eficácia comprovada contra bactérias e fungos e com grande potencial para novas descobertas. As plantas de solo terrestres são a biodiversidade mais estudada quando se deseja a obtenção de um produto natural com propriedades farmacológicas. Em contrapartida, o ambiente marinho foi por muitos anos negligenciado quanto ao estudo de espécies com potencial farmacológico, dificultado principalmente pelo difícil acesso a essa biodiversidade, que apresenta vasto potencial para compostos antimicrobianos (GALENO, MARTINEZ, 2007; HUGHES, FENICAL, 2010).

Desde 1986 se iniciou o desenvolvimento e a busca por novos produtos naturais oriundos da biodiversidade marinha. Através da identificação de compostos e espécies, essa comunidade tem mostrado características promissoras e com grande potencial antimicrobiano (CRISTANCHO et al., 2008). De acordo com MILLER e MILLER, (2011), os estudos no bioma marinho são desenvolvidos principalmente com macro e microalgas, cnidários, fitoplanctônicas, moluscos, esponjas, corais e tunicados, voltando-se primordialmente para a identificação de agentes antimicrobianos específicos para microrganismos patogênicos.

Os resultados das pesquisas com compostos bioativos de organismo marinhos são promissores, produzindo na última década uma abundância de agentes com utilização farmacêutica e industrial. No ano de 2013, em todo o mundo,

mais de mil compostos farmacologicamente ativos oriundos da biodiversidade marinha foram identificados e produzidos, exibindo grande potencial contra o câncer, vírus, bactérias, fungos, hipertensão arterial e hipercolesterolemia (HU et al., 2015).

Nos últimos 50 anos de estudos voltados à biodiversidade marinha, verificou-se que o representante com a maior fonte de moléculas com potencial bioativo são as esponjas marinhas (BLUNT et al., 2015). Pertencente ao filo Porífera, são seres invertebrados, multicelulares primitivos, morfologicamente simples, apesar de serem estruturalmente organizados e bioquimicamente complexos. Suas características biológicas os tornam candidatos ideais para o estudo farmacológico e clínico (OSINGA et al., 2003; DUQUE et al., 2003).

Entre os inúmeros compostos extraídos de organismos marinhos, 121 deles estão disponíveis no mercado, em virtude da sua eficácia farmacológica e das suas propriedades úteis nas pesquisas biomédicas. Dos 121 compostos, 43 são oriundos de esponjas marinhas, representando o filo com o maior número de compostos ativos no mercado (GERWICK; MOORE, 2012). No entanto, a exploração da atividade biológica dos metabólitos das esponjas marinhas é prejudicada pela coleta mais demorada dessa comunidade, tendo em vista a dificuldade no acesso e necessidade de uma grande quantidade de biomaterial para a realização dos experimentos (TORRES et al., 2002). Além disso, algumas espécies possuem seu habitat em águas profundas, com baixa pressão e como forma de autodefesa (são seres invertebrados) as esponjas também podem produzir metabólitos secundários altamente tóxicos (TOUATI et al., 2007; PERDICARIS et al., 2013). No entanto, o potencial dos metabólitos secundários com propriedades antibacterianas, anticoagulante, antiviral, antifúngicos, anti-inflamatórios, antituberculose, antimalária, antiplaquetária, e anticâncer são enormes e merecem investigação (FALKNER, 2001). Assim, mesmo com a dificuldade de coleta, dentre os milhares de organismos marinhos, as esponjas (Poríferos) são tidas como a maior fonte de compostos terapêuticos. Isso é justificado pelo fato de apresentarem em sua composição uma variedade de metabólitos secundários, sendo a maioria desses com benefícios à saúde humana. (NURHAYATI et al., 2014).

Em todo o mundo já existem no mercado inúmeros agentes farmacológicos extraídos de esponjas marinhas, entre os produtos mais desenvolvidos estão os antibióticos e antifúngicos, sendo cada vez maior o interesse por estudos pré-

clínicos e clínicos com essas esponjas (FAULKNER et al., 2000). Exemplos disso são as esponjas marinhas *Hyrtios erecta*, *Siliquariaspongia japonica* e *Homophymia confiera*, que são produtoras de antifúngicos eficazes disponíveis no mercado (MONKS et al., 2002), além da *Psammaplysina* sp., uma esponja marinha utilizada para controlar cepas de *Streptococcus aureus*, com eficácia comparada a do ciprofloxacino (MAYER et al., 2002). Os componentes majoritários das esponjas é o que propiciam a sua atuação farmacológica e clínica. Um estudo realizado por RAMOS et al., (2015), demonstrou que o potencial farmacológico das esponjas está ligado aos seus metabólitos secundários, especificamente os alcaloides, destacando-se os esteróis insaturados e os triterpenos pentacíclicos. Os compostos oriundos das esponjas com ação antimicrobiana contra bactérias e fungos, são formados devido à presença de terpenos, ésteres, peptídeos cíclicos, alcaloides, ácidos graxos, peróxidos, derivados de aminoácidos e metabólitos halogenados (SIPKEMA et al., 2005).

Em relação a outras atividades biológicas, as esponjas do gênero *Cliona varians* apresentam lectinas CLv (proteínas, não imunológicas, que se ligam de maneira reversível a glicoproteínas das membranas celulares, com ação biológica fungicida e antimicrobiana), com grande atividade anti-inflamatória (MOURA, 2006).

As esponjas do gênero *Aplysina* são ricas em metabolitos bromados (SILVA et al., 2015). O alcalóide do tipo bromotirosina, 11-oxoaerotionina foi isolado da *Aplysina lacunosa*, exibindo citotoxicidade *in vitro* contra células do câncer de cólon humano (HCT 116) (ACOSTA; RODRIGUEZ, 1992). Aaptaminas são alcalóides extraídos da esponja do gênero *Aaptos* e apresentam atividade anticancerígena contra as linhagens celulares THP-1, HeLa, SNU-C4, SK-MEL-28 e MDA-MB-231 (DYSHLOVOY et al., 2014). A *Cinachyrella* sp. é uma esponja com componentes majoritários do tipo cinachyramino, que apresenta atividade citotóxica contra células de HeLa (linhagem celular de carcinoma cervical humano) (SHIMOGAWA; KURIBAYASHI, 2006).

Cinachyrella sp. é um tipo de esponja marinha, pertencente ao reino Animalia, filo Porifera, classe Demospongiae, ordem dos Spirophoridae, família Tetillidae, gênero *Cinachyrella* e espécie *Cinachyrella* sp. (VACELET et al., 2007). A identificação dessa esponja foi feita pela primeira vez por Uliczka em 1929 no Brasil, sob o nome de *Cinachyra* sp. e só anos depois foi modificada para *Cinachyrella* sp.

(VACELET et al., 2007). 90 % dos representantes do filo Porífera são do grupo Demospongiae, formado por esponjas marinhas, as quais a *Cinachyrella* sp. faz parte, também conhecida também como bola de golfe e esponjas da lua (SZITENBERGET et al., 2013).

A esponja *Cinachyrella* sp. pode ser encontrada tanto na superfície, como mergulhadas profundamente nas águas, e estão comumente ligadas a colônias de corais, em formato globular, maciço, vertical ou de crescimento lateral (FERNANDEX et al., 2011). É uma esponja vermelha, quando se encontra exposta, cor proveniente de um pigmento encontrado em amebócitos, esta cor provavelmente funciona como uma proteção a luz solar. No mar, ela se torna amarela brilhante e quando mergulhada em solução etanólica, uma opção de extração, ela se torna acastanhada, é de tamanho pequeno, o seu diâmetro varia de dois a três centímetros (VACELET et al., 2007). Assim como em outras espécies de esponjas, a *Cinachyrella* sp. apresenta componentes majoritários de alcalóides, esteroides insaturados e triterpenos penta cíclicos que conferem a atividade antimicrobiana ao extrato buto, atuando sobre colônias de bactérias e fungos e causando a sua destruição. A presença desses metabólitos podem ser oriundos de um mecanismo de defesa utilizado por esses organismos marinhos contra predadores, que podem impedir o seu processo de desenvolvimento desde as primeiras fases celulares, garantindo a segurança da espécie (RAMOS, D'ARMAS, MARTINEZ, 2015; EL-AMRAOUI et al., 2010). Alguns desses compostos metabólicos podem estar vinculados com a formação da membrana plasmática das células das esponjas, onde os compostos de origem estereoidal tem uma significativa participação (MUN et al., 2015).

A espécie *Cinachyrella* sp. é uma fonte em potencial de metabólitos únicos, incluindo compostos citotóxicos e anticancerígenos para linhas de células tumorais humanas de T47D (NURHAYATI et al., 2014). Apresenta também forte potencial antimicrobiano, em um estudo realizado por Marinho, et al., (2008), a *Cinachyrella* sp. mostrou atividade antibacteriana significativa contra bactérias de importância médica, sendo a maioria resistente a antibióticos, apresentando espectro de ação maior sobre bactérias Gram-positivas. Dessa forma, considerando o potencial antimicrobiano da *Cinachyrella* sp. faz-se importante um estudo com o objetivo de investigar o seu potencial antibacteriano e fungicida sobre patógenos orais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano do extrato bruto etanólico (EtOH) e das fases hidroalcóolica e clorofórmio (CHCl₃) da *Cinachyrella* sp. sobre patógenos orais.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar a CIM (Concentração inibitória mínima) e a CFM (Concentração fungicida mínima) do extrato bruto etanólico (EtOH) e das fases hidroalcóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. sobre as cepas:

- *Candida albicans* CBS 562
- *Candida. tropicalis* CBS 94
- *Candida krusei* CBS 593

2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato bruto etanólico (EtOH) e das fases hidroalcóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. sobre as bactérias:

- *Streptococcus oralis* ATCC 104115
- *Streptococcus sanguinis* ATCC 104115
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Esponja marinha (*Cinachyrella* sp.)

O extrato bruto etanólico (EtOH),bem como as fases hidroalcóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. foram cedidos pela pesquisadora Profa. Dra. Barbara Viviana Santos.

4.2. Local de realização da pesquisa

Os testes relativos às atividades antifúngica e antibacteriana da *Cinachyrella* sp. foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3. Microrganismos

4.3.1. Cepas fúngicas

Foram utilizadas neste estudo cepas fúngicas de referência de *Candida* spp. da Coleção Holandesa - Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS): *C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 593.

4.3.2. Cepas bacterianas

Foram utilizadas neste estudo as cepas de *S. oralis* ATCC 104115, *S. sanguinis* ATCC 104115 e *E. faecalis* ATCC 29212 para avaliação da atividade antibacteriana.

4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM foi realizada a técnica de microdiluição em placa de 96 poços (STANDARDS, 2002). Para isto, as cepas fúngicas foram inicialmente reativadas em meio Caldo de Sabouraud Dextrose (CSD) e as cepas bacterianas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e então incubadas em estufa a 37°C por 24 horas em condições normais ou de microanaerofilia de acordo com o microrganismo testado. Os inóculos das cepas fúngicas foram ajustados a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL, e, em seguida, diluídos para obter uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL após a inserção de 100 µL em cada poço. Os inóculos das cepas bacterianas foram ajustados a 1×10^6 UFC/mL, chegando a concentração final de 5×10^5 UFC/mL na placa de microdiluição.

4.5. Ensaio de microdiluição

Para a realização do teste, cada poço das placas de 96 poços recebeu inicialmente 100 µL de CSD ou de BHI para o teste antifúngico ou antibacteriano, respectivamente. Em seguida, 100 µL do extrato bruto etanólico (EtOH) bem como as fases hidroalcolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp foram adicionados aos primeiros poços da placa, com posterior diluição seriada para os poços subsequentes com concentrações entre 2500 e 19,53 µg/mL para o teste sobre as cepas fúngicas e de 1000 a 7,81 µg/mL para o teste antibacteriano. Como controle positivo para o teste de atividade antifúngica foi utilizada uma solução de nistatina (48 µg/mL) obtendo concentrações seriadas que variaram de 12 µg/mL a 0,09 µg/mL. Já para os testes sobre bactérias a solução de clorexidina foi utilizada como controle positivo com concentrações seriadas entre 500 µg/mL e 3,9 µg/mL. Também foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura e da substância, bem como o controle de crescimento dos microrganismos. Após a adição dos inóculos, as microplacas foram incubadas em estufa a 35° C por 24 horas (STANDARDS, 2002).

A seguir, para confirmação da presença de cepas fúngicas viáveis, foi realizado o teste de respiração celular com a adição de 50 µL do corante 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TCT) a 2% em cada poço e incubação a 35°C por 24h. Na presença de células viáveis, os poços com TCT (Fabricante dinâmica química LTDA, Brasil) coram em vermelho, indicando a presença de atividade das enzimas desidrogenases do processo de respiração celular, com a presença de aglomerados de células viáveis no fundo dos poços (DESWAL; CHAND, 1997).

No teste de microdiluição para cepas bacterianas foi empregado o revelador resazurina a 0,01% com a adição de 20µL a cada poço. Após 2 horas os poços que não apresentaram atividade microbiana permaneceram incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento coram de vermelho (DUARTE et al., 2007). Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata para cada cepa teste. A CIM foi considerada a moda entre as menores concentrações do produto em teste capazes de inibir o crescimento dos microrganismos.

4.6. Determinação das concentrações fungicida (CFM) e bactericida mínima (CBM)

Após a determinação da CIM foi realizado o procedimento para a obtenção da CFM e CBM. Para isto, foi realizado o subcultivo de 50 µL dos poços referentes à CIM e dos poços referentes a duas e quatro vezes a CIM (CIMx2 e CIMx4) em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (para cepas fúngicas) ou Ágar Müeller Hinton para subcultivo antibacteriano. Após incubação a 37° C por 48 horas, o crescimento microbiano foi verificado visualmente com base nos controles e determinada a CBM para cada cepa, a qual foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os resultados da atividade antifúngica de *Cinachyrella* sp, bem como da nistatina (controle positivo- antifúngico padrão) estão apresentados nas Tabelas 1 (CIM) e 2 (CFM). O teste de microdiluição demonstrou um potencial efeito da *Cinachyrella* sp, em especial da fase CHCl₃, na inibição do crescimento de diferentes espécies de *Candida*. Esta ação foi semelhante sobre *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 593, com uma CIM de 156,25 µg/mL para a fase CHCl₃ e de 625 µg/mL para o extrato bruto EtOH e fase hidroalcoólica. A ação sobre *C. albicans* CBS 562 foi menor, sendo obtida uma CIM de 312.5 µg/mL para a fase CHCl₃ de 1250 µg/mL como para as fases EtOH e hidroalcoólica, sendo, portanto, a *C. albicans* a espécie mais resistente. Já a nistatina inibiu o crescimento de *C. albicans* CBS 562 com uma CIM de 0,75 µg/mL, sendo verificada para *C. krusei* CBS 593 uma CIM de 6,00 µg/mL e para *C. tropicalis* CBS 94 de 1,5 µg/mL.

A CIM foi determinada através da identificação do último poço em que não houve crescimento microbiano. Tendo em vista que o crescimento microbiano é evidenciado através do TCT, que por sua vez cora em tom arroxeados os poços em que há respiração celular, a CIM é identificada no último poço em que não houve mudança de coloração após a reação com o corante. A metodologia desse estudo foi validada mediante a ausência de crescimento fúngico nos controles de esterilidade do meio e da substância, e a presença desse crescimento no controle de crescimento dos microorganismos utilizados.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e para as fases hidroalcolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida albicans* CBS 562; *Candida. tropicalis* CBS 94 e *Candida krusei* CBS 593.

MICROORGANISMOS	CIM-SUBSTÂNCIAS (µg/mL)			
	EtOH	HIDROALCÓOLICA	CHCl ₃	NISTATINA
<i>C. albicans</i> CBS 562	1250	1250	312.5	0,75
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	625	625	156,25	1,5
<i>C. krusei</i> CBS 593	625	625	156,25	6,00

Fonte própria do pesquisador

Para confirmar a menor concentração das fases da *Cinachyrella* sp. que impediu o crescimento visível das cepas avaliadas, foi realizado o subcultivo dos poços referentes à CIM, a duas (CIMx2) e quatro vezes (CIMx4) o seu valor, para assim determinar os valores da CFM (Tabelas 2-4)). Para *C. albicans* CBS 562, a CFM das fases EtOH e hidroalcolica correspondem às CIMs obtidas inicialmente no teste de microdiluição, enquanto para a fase CHCl₃ a CFM foi obtida para a CIM x2 (concentração de 625 µg/mL (Tabela 2)). Já para as cepas de *C. tropicalis* CBS 94 (Tabela 3) e *C. krusei* CBS 593 (Tabela 4), os valores obtidos nos testes da CIM foram confirmados na CFM para todas as fases da *Cinachyrella* sp. testadas.

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e para as fases Hidroalcolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida albicans* CBS 562.

<i>C. albicans</i> CBS 562	CFM-SUBSTÂNCIAS (µg/mL)			
	EtOH	HIDROALCÓOLICA	CHCl ₃	NISTATINA
CIM (1250)	SC	SC	CRESCIMENTO	0,75
CIM X 2 (2500)	SC	SC	SC	1,5
CIM X 4 (5000)	-	-	-	3

* S/C: sem crescimento

Fonte própria do pesquisador

Tabela 3. Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (ETOH) e para as fases hidroalcóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida tropicalis* CBS 94.

C. tropicalis CBS 94	CFM-SUBSTÂNCIAS (µg/mL)			
	EtOH	HIDROALCÓOLICA	CHCl₃	NISTATINA
CIM (625)	SC	SC	SC	0,75
CIM X 2 (1250)	SC	SC	SC	1,5
CIM X 4 (2500)	-	-	-	3

* S/C: sem crescimento

Fonte própria do pesquisador

Tabela 4. Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (ETOH) e para as fases hidroalcóolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para nistatina frente a *Candida krusei* CBS 593.

C. krusei CBS 593	CFM-SUBSTÂNCIAS (µg/mL)			
	ETOH	HIDROALCÓOLICA	CHCl₃	NISTATINA
CIM (625)	SC	SC	SC	0,75
CIM X 2 (1250)	SC	SC	SC	1,5
CIM X 4 (2500)	-	-	-	3

* S/C: sem crescimento

Fonte própria do pesquisador

5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Conforme descrito previamente, a atividade antibacteriana da *Cinachyrella* sp. foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços (Tabela 5). A CIM foi determinada através da identificação do último poço em que não houve crescimento bacteriano. Sabendo que o crescimento bacteriano é evidenciado através da utilização da resazurina, que por sua vez cora em tom avermelhado os poços em que há respiração celular /células viáveis, a CIM é identificada no último poço em que não houve mudança de coloração após a reação com o corante.

Com os resultados obtidos identificou-se um potencial da *Cinachyrella* sp. para inibir o crescimento de *S. sanguinis* somente nas fases Hidroalcóolica e CHCl₃, obtendo-se valores de CIM de 625 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente. Entretanto,

para as cepas de *S. oralis* e *E. faecalis*, tanto o extrato bruto como as fases da *Cinachyrella* sp. apresentara ação inibitória sobre o crescimento destas espécies. A clorexidina empregada como controle positivo inibiu o crescimento das cepas bacterianas com uma CIM de 2 µg/mL (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em µg/mL, para o extrato bruto etanólico (EtOH) e para as fases hidroalcolica e CHCl₃ da *Cinachyrella* sp. e para clorexidina frente ao *Streptococcus sanguinis*; *Streptococcus oralis* e *Enterococcus faecalis*.

MICROORGANISMOS	CIM-SUBSTÂNCIAS (µg/ml)			
	ETOH	HIDROALCÓOLICA	CHCl ₃	CLOREXIDINA
<i>S. sanguinis</i>	SA	62,5	125	2
<i>S. oralis</i>	SA	SA	SA	2
<i>E. faecalis</i>	SA	AS	SA	2

* S/A: sem ação

Fonte própria do pesquisador

Para verificar os valores obtidos nos testes de obtenção da menor concentração que impedem o crescimento visível de *S. sanguinis* na presença dos diferentes frações da *Cinachyrella* sp., o subcultivo dos poços referentes à CIM, CIM x 2 e CIM x 4 para este microrganismo foi realizado por 24 h, para determinação da CBM. Assim, o valor da CBM verificado para as fases hidroalcolica e CHCl₃ foram equivalentes às CIMs determinadas anteriormente no teste de microdiluição.

6. DISCUSSÃO

O exponencial aumento da resistência medicamentosa apresentado por microrganismos patogênicos, além dos efeitos colaterais acentuados provocados pela maioria dos fármacos disponíveis no mercado, tem incentivado a busca por novos medicamentos para uso clínico e laboratorial (MARINHO et al., 2010). Embora o Brasil seja o segundo país com o mais extenso litoral, ficando atrás apenas da Austrália, a sua exploração e o desenvolvimento da química e da farmacologia dos organismos marinhos não foi levada em consideração por muitos anos, tendo em vista que o foco das pesquisas de produtos naturais brasileiros estava direcionada somente para as pesquisas com plantas medicinais. Apenas recentemente, no Brasil, é que se começou a estudar a química e o potencial terapêutico dos organismos marinhos (TORRES et al., 2002).

O mar é uma fonte quase inesgotável de novas fontes naturais, apresentando uma variedade de espécies vegetais, animais e microbianas com vasto potencial para o desenvolvimento de substâncias antimicrobianas, que podem ser obtidos em diferentes extratos, auxiliados por sofisticadas técnicas de extração, separação e análise. Neste contexto, as esponjas representam a mais interessante fonte de metabólitos secundários da biodiversidade marinha, apresentando potencial atividade antimicrobiana como resultado da citotoxicidade dos seus subprodutos (TOUATI et al., 2007). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico e suas fases hidroalcoólica e clorofórmico (CHCl₃) da *Cinachyrella* sp. sobre patógenos orais.

A partir dos resultados obtidos para a determinação da atividade antifúngica da *Cinachyrella* sp. foi possível identificar considerável potencial antifúngico na inibição do crescimento das diferentes espécies de *Candida*, em especial da fase CHCl₃. Para as cepas de *Candida tropicalis* CBS 94 e *Candida krusei* CBS 593, a CIM obtida para fases EtOH e Hidroalcoólica foi de 625 µg/mL enquanto para a fase CHCl₃ foi verificada uma CIM de 156,25 µg/mL. Já para *C. albicans* CBS 562 a inibição do crescimento ocorreu, porém na presença de maiores concentrações das substâncias teste, sendo observadas uma CIM de 1250 µg/mL para o extrato bruto etanólico (EtOH) e para as fases hidroalcoólica e 312.5 µg/mL para a fase CHCl₃. Esta melhor ação da fase CHCl₃ se deve possivelmente a propriedade apolar dos

seus componentes, característica predominante na parede celular dos fungos, o que favorece sua interação e ação antifúngica (GALEANO; MARTINEZ, 2007).

Alguns estudos avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes esponjas marinhas, incluindo a espécie *Cinachyrella*. Neste contexto, em um estudo *in vitro* realizado por EL-AMRAOUI et al., (2010), em que se utilizou o método de difusão em ágar para verificar a atividade antifúngica e antibacteriana de 26 extratos obtidos de 13 esponjas marinhas. As fases aquosas e / ou orgânicas de todos as 13 esponjas marinhas investigadas apresentaram alguma atividade em pelo menos um microrganismo testado, onde todas as espécies de esponjas foram efetivas contra bactérias, entre estas a *Escherichia coli* CIP 54127 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

No entanto, apenas três espécies de esponjas exerceram atividade sobre cepas fúngicas, entre elas, a espécie *Cinachyrella*, que apresentou ação contra a *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* R2 CIP1275.81, esta última resistente a anfotericina B. Igualmente, no presente estudo, as três fases de *Cinachyrella* sp. foram capazes de inibir o crescimento das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, porém utilizando a técnica de microdiluição ao invés do teste de difusão em ágar.

A atividade antimicrobiana de sete esponjas marinhas coletas na costa da Tunísia foi testada sobre *E. faecalis* ATCC 29212, bem como sobre cepas fúngicas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, a partir de isolados clínicos de pacientes (TOUATI et al., 2007). A fase acetato de etila das sete esponjas avaliadas apresentou uma melhor atividade antibacteriana comparada às outras fases testadas, a exemplo da esponja *Axenella damicornis* que, na sua fase acetato de etila, exibiu atividade significativa contra todas as espécies bacterianas testadas. Entretanto, a fase orgânica da espécie *Agela oroides* não apresentou atividade sobre *E. faecalis*. De forma semelhante, nenhuma das fases da *Cinachyrella* sp. testadas no presente estudo foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis*.

Em contrapartida, o teste da atividade antifúngica das espécies marinhas analisadas no estudo de TOUATI et al., (2007), não obtiveram resultados positivos, mostrando capacidade reduzida de inibição do crescimento das cepas fúngicas. Já no presente estudo, foi verificada uma maior efetividade da esponja *Cinachyrella* sp sobre fungos visto que todas as formulações testadas (EtOH, hidroalcoólica e CHCl₃) foram efetivas contra as cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, com

resultados bastante satisfatórios. Portanto, o potencial antimicrobiano das esponjas marinhas tem sido comprovado, porém sua maior ação antibacteriana ou antifúngica depende da espécie de esponja e seus componentes majoritários.

Outro estudo *in vitro*, realizado por MARINHO et al., (2010), avaliando a eficácia de fases diferentes de 12 esponjas coletadas no Brasil, resultou na ação inibitória de 10 dessas esponjas sobre bactérias resistentes a antibióticos. Entre as esponjas analisadas a espécie *Cinachyrella* sp. obteve um dos maiores espectros de ação, inibindo principalmente Cocos Gram-positivos. No entanto, de forma semelhante ao nosso estudo, a *Cinachyrella* sp. não foi eficaz contra *E. faecalis*, que foi inibida por outra espécie de esponja, a *P. citrina*, em sua fase aquosa.

Com o objetivo de identificar novos composto com potencial para uso terapêutico, GALEANO e MARTINEZ, (2007), analisaram a atividade antimicrobiana de 24 esponjas marinhas do Golfo Urabá, região do caribe colombiano, mais especificamente de três diferentes fases: extrato bruto metanólico, CHCl₃ e n-Hexano sobre as espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e sobre cepas fúngicas de *C. albicans*. Das 24 espécies de esponjas analisadas, 14 mostraram atividade contra *C. albicans*, com destaque para as esponjas da espécie *Leucetta aff. floridana* e *Cinachyrella*, que exerceram atividade satisfatória das três fases estudadas em relação as outras fases de esponjas analisadas, com destaque para a fase CHCl₃ da *Cinachyrella*. Esta melhor ação da fase CHCl₃ corrobora com nossos achados, sobretudo no que se refere à atividade antifúngica. Essa maior efetividade se deve possivelmente as suas propriedades apolares dos seus componentes, característica predominante na parede celular dos fungos, o que favorece sua interação e ação antifúngica (GALEANO; MARTINEZ, 2007).

Conscientes da necessidade da valorização da biodiversidade marinha, assim como da importância e da continuidade do processo de busca por produtos antimicrobianos oriundos de espécies marinhas para utilização na indústria farmacêutica, RAMOS et al., (2015), avaliaram a letalidade e o potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários de seis esponjas marinhas extraídas da bahia de Mochima, na Venezuela. Foram realizados testes químicos e de bioatividade da fase apolar acetato de etila das seis esponjas analisadas, entre elas, *Cinachyrella* sp. Os resultados desse estudo não foram favoráveis quanto à ação antibacteriana e antifúngica da fase acetato de etila da *Cinachyrella*, que não teve

potencial para inibir nenhum dos microrganismos testados, nem mesmo o fungo oportunista *C. albicans*. No presente estudo demonstramos que o extrato bruto etanólico (EtOH) e a fase hidroalcolólica e, em maior potencial, a fase CHCl₃ inibiram o crescimento de diferentes cepas fúngicas, incluindo-se a *C. albicans*. Já os resultados das análises de GALENO e MARTINEZ, (2006) e EL-AMRAROUÏ et al., (2010), de maneira semelhante aos nossos dados, também demonstraram a eficácia da fase CHCl₃ sobre *C. albicans*. Esses dados sugerem que esta fase da espécie *Cinachyrella* sp. tenha potencial inibitório maior em cepas fúngicas que a fase acetato de etila.

CRISTANCHO et al., (2008), se propuseram a avaliar em um dos seus estudos a atividade antimicrobiana *in vitro* das fases orgânicas de 15 esponjas marinhas extraídas do mar do Caribe sobre microrganismos potencialmente patogênicos, sendo a *C. albicans* a única espécie de fungo testada, e a nistatina utilizada como controle positivo. Das 15 esponjas avaliadas, quatro tiveram potencial para inibir *C. albicans* e somente a *Xestospongia proxima* apresentou um halo de inibição superior ao da nistatina. Para as demais espécies de esponjas, a inibição foi alcançada após o aumento da concentração dos extratos. Quanto à espécie marinha *Cinachyrella* sp., também avaliada neste experimento, não se obteve resultados positivos de inibição de *C. albicans*, indo ao encontro dos resultados obtidos por RAMOS et al., (2015) e confrontando os resultados do estudo de EL-AMRAROUÏ et al., (2010) e de GALEANO e MARTINEZ, (2007), assim como os do presente estudo em relação à efetiva inibição do crescimento de cepas de *C. albicans* induzida por extratos de *Cinachyrella* sp.

De acordo com RAMOS et al., (2015), a capacidade antimicrobiana das esponjas está relacionada com a presença e a quantidade de alcaloides, esteroides insaturados e triterpenos pentacíclicos, que fazem parte de um mecanismo químico de defesa das esponjas, para evitar parasitas, como larvas, que uma vez fixadas a elas podem interferir no processo de filtração das esponjas, comprometendo a sua sobrevivência e desenvolvimento.

Assim, a literatura evidencia por meio de estudos *in vitro* uma potencial atividade antimicrobiana de esponjas marinhas, incluindo-se a *Cinachyrella* sp. As evidências da ação antifúngica são mais recorrentes, sendo a maioria dos relatos contra cepas de *C. albicans*. Apenas dois estudos encontrados na literatura relatam

testes microbiológicos de esponjas marinhas sobre cepas de *C. tropicalis* (EL-AMRAOUI et al., 2010; TOUATUI et al., 2007) e apenas um sobre *C. krusei* (TOUATUI et al., 2007), no qual obteve-se resultados negativos para as esponjas testadas, confrontando os resultados no presente estudo, em que houve uma inibição de crescimento satisfatório para estas espécies.

Poucos são os relatos da literatura sobre a ação antibacteriana das esponjas marinhas, incluindo-se a *Cinachyrella* sp. Com os resultados obtidos através dos testes para a determinação da atividade antibacteriana das fases da *Cinachyrella* sp., nosso estudo demonstrou um potencial das fases CHCl₃ e hidroalcoólica de *Cinachyrella* sp. para inibir o crescimento de *S. sanguinis*, com valores de CIM de 125 µg/mL e 625 µg/mL, respectivamente. Entretanto, nenhuma das fases da *Cinachyrella* sp. apresentou ação as cepas de *S. oralis* e *E. faecalis*.

A ação das esponjas sobre bactérias é maior nos Gram-positivos, sendo poucos os relatos de inibição sobre microrganismos Gram-negativos (MARINHO et al., 2010). Não foram encontrados relatos na literatura de estudos testando nenhuma espécie de esponja marinha sobre espécies bacterianas de *S. sanguinis* e *S. oralis*, não sendo possível realizar nenhum tipo de comparação entre estudos em relação a essas espécies bacterianas.

Até o presente momento, este estudo é um dos pioneiros que relata testes microbiológicos *in vitro* de uma espécie de esponja marinha, *Cinachyrella* sp. sobre microrganismos bacterianos com potencial patogênico, encontrados na cavidade oral de humanos, tratando-se do primeiro relato de inibição da espécie bacteriana *Streptococcus sanguinis* por uma esponja marinha, *Cinachyrella* sp., sendo ainda o primeiro relato de teste desta espécie marinha sobre *E. faecalis*, com resultados negativos para essa espécie bacteriana.

Na crescente busca por produtos naturais, farmacologicamente ativos, que sejam eficazes contra microrganismos patogênicos, que não cause resistência microbiana e diminua os efeitos colaterais, as espécies de esponjas marinhas tornam-se fontes ideais. Em virtude do exposto, percebe-se o grande potencial da *Cinachyrella* sp. sobre patógenos orais, com especial efeito antifúngico. Entretanto, deve-se ressaltar que os resultados satisfatórios obtidos neste estudo no que se refere à ação antifúngica de *Cinachyrella* sp. (em especial da fase CHCl₃), bem como a ação inibitória sobre o crescimento de *S. sanguinis*, são preliminares e

limitados, sendo necessária a realização de mais estudos *in vitro*, sobre diferentes patógenos orais, bem como ensaios de biofilme mono e multi-espécie para reforçar os dados obtidos e encorajar investigações futuras em estudos *in vivo* e, por fim, avanços para ensaios clínicos afim de se aplicar um agente terapêutico à base deste produto natural de origem marinha.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados preliminares obtidos no presente estudo, foi possível identificar um potencial antifúngico considerável de *Cinachyrella* sp. na inibição do crescimento das diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* CBS 94, *C. krusei* CBS 593), em especial da fase CHCl₃, bem como uma ação antimicrobiana sobre *S.sanguinis*. Entretanto, mais estudos *in vitro* empregando a *Cinachyrella* sp. sobre diferentes microrganismos orais e inclusive em modelos de biofilme que mimetizem melhor as condições da microbiota *in vivo* devem ser realizados. Estes ensaios preliminares indicam que as esponjas marinhas são uma fonte em potencial para novos metabólitos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. M. F.; MESQUITA, B.S.; SILVA, E.D.; QUEIROZ, F.V. C.; MACÊDO, L.L.A.; CASTRO, R.D.C. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 51, n.3, p. 259-269,2014.
- ACOSTA, A.; RODRIGUEZ, A. 11-oxoaerothionin: A cytotoxic antitumor bromotirosine-derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. **J. Nat.Prod.**, v.55, n.7, p. 1007-1012,1992.
- ALMEIDA, R.F.; PINHO, M.M.; LIMA, C.; SANTOS, P.; BORDALO, C. Associação entre Doença Periodontal e Patologias Sistêmicas. **Rev. Clin Geral**. v. 22, p. 90-379,2006.
- ALVES, C.; ANDION, J.; BRANDAO, M.; MENEZES, R. Mecanismos Patogênicos da Doença Periodontal Associada ao Diabetes Melito. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 51, n.7,2007.
- AMARAL, S.M.; CORTÊS, A.Q.; PIRES, F.R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J. Bras. Pneumol**. v. 35, n.11, p.1116-1124,2009.
- ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA, **AMIB**. Departamento de Odontologia e Departamento de Enfermagem. Procedimento operacional-padrão,2013.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med**, v.78, n.922, p: 455-459, 2002.
- BAEDER, F. M.; CABRAL, G. M. P.; PROKOPOWITSCH, I.; ARAKI, A. T.; DUARTE, D. A.; SANTOS, M. T. B. R. Condição Odontológica em Pacientes Internados em Unidade de Terapia Intensiva. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.**, v.12, n.4, p.517-520, out. -dez. 2012.
- BAUROTH, K.et al. The efficacy of an essential oil antiseptic mouthrinse vs. Dental floss in controlling interproximal gingivitis: a comparative study. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v.134, n. 3, p.359-365, Mar.2003.
- BONAN, P. R. F.; PIRES, F. R.; LOPES, M. A.; HIPÓLITO JÚNIOR, O. di. Colonização e espécies de *Candida* em pacientes submetidos à radioterapia cervicofacial. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p: 407-412, dez. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.17 de 24 de fevereiro de 2000.Brasilia, DF, 2000**.Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em:http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucao_sanitaria/17.pdf
- BUCHAUL, R, B. **Histórico da fitoterapia**.2001. (Série Cadernos de Fitoterapia). Disponível em:<<http://www.reocites.com/buchau/cadernos.htm>>.

BUGNO, A. et al. Antimicrobial efficacy of Curcuma zedoria extract as assessed by linear regression compared whit comercial mouthrinses. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, n.3, p.440-445, Set.2007.

BUNT, J., COPP, B., KEYZERS, R., MUNRO, M.; PRINSEP, M. Marine natural products, **Nat. Prod. Rep**, v. 32, p. 116-211, 2015.

BLUNT, J.W.; WOPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v.34, n.3, p.235-295, 2017.

BUSSADORI, C. M. **Evaluation of oral Rinses in biological activity of biofilm formed in orthodontic brackets**. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

CARRANZA JR., F.A.; NEWMAN M.G.; TAKEI H.H. **Periodontia clínica**, 10^a ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009.

CRISTANCHO, J.A.M.; NEWMARK, F.U.; ACEVEDO, M.S.; NIEVES, J.S. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. **Rev Esp Quimioter**, v.21, n.3, p. 179-174, 2008.

DESWAL, D.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi e ohashi) seeds. *Seed Science and Technology*, v. 25, n.3, p.409-417, 1997.

DINIZ, C.G. Ecologia microbiana da cavidade bucal: biofilmes e placa dental. **Microbiologia aplicada a Odontologia**. 2012.

DINIZ, D.N.; MACEDO-COSTA, M.R.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIRA, J. V.; Higino, J.S. In vitro antifungal effect of leaves and bark of *Myrciaria cauliflora* berg. extracts upon oral microorganisms. **Rev Odontol UNESP**. v.39, n.3, p. 151-156, 2010.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.197-201, 2007.

DUQUE, C.; PUYANA, M.; OSORNO, O.; ZEA, S. Visión retrospectiva de las investigaciones en productos naturales marinos en Colombia durante los últimos 15 años en el mundo marino de Colombia: investigación y territorios olvidados. **Red de estudios del mundo marino**. Bogotá: REMAR, p. 313-29, 2003.

DYSHLOVOY, S.; FEDOROV, S.; SHUBINA, L.; KUZMICH, A.; BOKEMEYER, C.; KELLER-VON AMSBERG, G.; HONECKER, F. Aaptamines from the Marine Sponge *Aptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell Lines and Modulate AP-1-, NF- κ B-, and p53-Dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. **Biomed.Res. Int.**, p. 1-7, 2014.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Nat Prod Rep**, v.17 p. 7-55, 2000.

FAULKNER, D. J. Marine natural Product. **Nat. Prod. Rep.**, v.18, p.1- 49,2001.

FERNANDEX, J. C.; PEIXINHO, S.; PEINHEIRO, U. S.; MENEGOLA, C. Three new species of *Cinachyrella* Schmidt.1868 (Tetillidae, Spirophorida, Demospongia) from Bahia, Northeastern Brazil. **Zootaxa.**, p. 51-67,2011.

FOSCHI, F.; IZARD, J.; SASAKI, H.; SAMBRI, V.; PRATI, C.; MULLER, R.; STASHENKO, P. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. **J. Dent Res.** v.85 n.8, p. 761-765, 2006.

FREIRES, I. A.; ALVES, L.A.; JOVITO, V.C.; ALMEIDA, L.F.D.; CASTRO, R.D.; PADILHA, W.W.N. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme Dentário. **Odontol. Clín.-Cient**, v.9, n. 8, p. 43-139,Recife, 2010.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; ALENCAR, S. M. ; ROSALEN, P. L. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: **A Systematic Review. Molecules (Basel. Online)**, v. 20, p. 7329-7358, 2015.

GALEANO, E.; MARTINEZ, A. Antimicrobial activity of marine sponges from Uraba´ Gulf, Colombian Caribbean region. **Journal de Mycologie Medicale**, v.17, p. 21-24,2007.

GALLITSCHKE, N.et al. Inhibition of interproximal plaque metabolism using CPCmouthrinse. **The Journal of Clinical Dentistry**. Yardley, v. 15, p.59-65,2004.

GARG, A. K.; MALO, M. Manifestations and treatment of xerostomia and associated oral effects secondary to head and neck radiation therapy. **J Am Dent Assoc.**, v.128, n.8, p. 1128-1133, ago.1997.

GERWICK, W.; MOORE, B. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chem. Biol.**, v.19, p.85-98,2012.

GRANJEIRO, J.M.et al. O cloreto de cetilpiridinio e a placa bacteriana: uma revisão. **Revista da associação paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v.47, n.2, p.1019-1022, mar. - Abr.,1993.

GUIMARAES, A.R.D.; PERES, M.A.; VIEIRA, R.S.; FERREIRA, R.; RAMOS-JORDE, M.L, APOLINARIO, S.; DEBOM, A. Self-perception of side effects by adolescents in a clohexidine-fluorede-based preventive oral health program. **J Appl Oral Sci.** v.14, n.4, p.6-291,2006.

HAMADA, S; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J. Dent. Res.** 63: 407-411, 1984.

HESPANHOL, F.L.; TINOCO, E.M.B; TEIXEIRA, H.G.C.; FALABELLA, M.E.V.; ASSIS, N.M.S.P. Manifestações bucais em pacientes submetidos a quimioterapia. *Ciências e saúde coletiva*, v.15, p. 1085-1094, 2010.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.; YUAN, J. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. v.13, p. 202-221, Mar.,2015.

HUGHES, C.C.; FENICAL, W. Antibacterials from the Sea. *Chem. Eur. J.* v.16, p. 12512-12525,2010.

JARDIM, E.G.J.; MERINO, V.R.C.; CAMPOS, M. J. A. Aspectos Microbiológicos de Infecções Bucais: Relação Ecológica e de Virulência. **Laboratório de Anaeróbios. Departamento de Microbiologia.** Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo,2015.

LEMOS, A.C. O; KATZ, C. R. T. Condições de saúde bucal e acesso ao tratamento odontológico de pacientes com paralisia cerebral atendidos em um centro de referência do Nordeste-Brasil. **Rev. CEFAC**, v.14, n.5, p. 861-871, set.-out.,2012.

LIMA, J.E.O. Cárie dentária: um novo conceito. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial.** Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, nov. /dez.,2007.

MARINHO, B.V.S.; ARAUJO, A.C.S.O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Journal of Dentistry.** Cairo, v.6.n.4.p.124-131,2007.

MARINHO, P. R.; GUILHERME, R. S.; MURICY, M F. L.; SILVA, M.G.M.; MARINELLA, S. L. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 267-275,Abr/Mai.,2010.

MARQUES, G. Biodiversidad marina: aproximación con referencia al Caribe. Em *Ecosistemas estratégicos y otros estudios de ecologia ambiental.* **Bogotá: Fondo FEN**, Colombia, p. 67-102, 1996.

MAYER, A.M.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 1999: compounds whit antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.132, p. 39-315, 2002.

MELO, I. A.; GUERRA, R. C. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. **SALUSVITA**, Bauru, v. 33, n. 3, p. 389-414, 2014.

MEURMAN, J.H.; HÄMÄLÄINEN, P. Oral health and morbidity: implication of oral infections on the elderly. **Gerodontology**. v. 16, p. 3-16,2006.

MILLER, A.A.; MILLER, P.F. Emerging Trends in Antibacterial Discovery: Answering the Call to Arms; **Caister Academic Press: Norfolk**, UK, 2011.

MONKS, N.R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A.; FARIAS, F.; SCHAPOVAL, E, SUYENAGA, E, et al. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **J Exp Mar Biol Ecol**, v.28, p. 1-281,2002.

MOREIRA, A.C.A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v.8, n.2, p.153-161,2009.

MOURA, R. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comp. Biochem. Phys. A - Molecular and Integrative Physiology**, v. 145, n. 4, p. 517-523.

MUFFLER, K.; SCHLEGEL, C.; ZIEGLER, C.; AURICH, J.C.; ULBER, R. Produktive Biofilme. **Biospektrum**, v.19, february, 2013.

MUN, B.; WANG, W.; KIM, H.; HAHN, D.; YANG, I.; WON, D.; KIM, E.; LEE, J.; HAN, C.; KIM, H.; KANG, H. Cytotoxic 5 α ,8 α -epidioxy sterols from the marine sponge *Monanchora* sp. **Archives of Pharmacal Research**, v.38, p.18-25,2015.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, P.972,2009.

NURHAYATI, A.P.D.; R.P.S.; ISTRİYATI, ABDILLAH, I, S. Cytotoxic Activity of Ethanol Extract and Fractions of the Marine Sponge *Cinachyrella* sp. **J.Pharm. Sci. & Res.**, v.12, n. 6, p. 404-410, 2014.

NURHAYATI, A.P.D.; R.P.S.; ISTRİYATI, ABDILLAH, I, S.; VOOGT, N.J. The Anticancer Activity of Marine Sponge *Cinachyrella* sp. (Family Tetillidae). **The Journal for Technology and Science**, V. 25, N.3, December, 2014.

OSINGA, R. Biotechnological aspects of marine sponges. **J Biotechnol**, v. 2, p. 91-100, 2003.

PALOMBO, E. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evidence-based complementary and alternative medicine: e CAM**, Oxford, v.2011, p.1-15, Jan,2011.

PASTER, B.J.; OLSEN, I; AAS, J.A; DEWHIRST, D. The breadth of the bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontology** 2000 n.2, p. 80-87, 2006.

PAULA, R.C.; MONTELLI, A. C.; RUIZ, L. S.; BATISTA, G. C. M.; MATSUMOTO, F. E.; VOLPEARONI, M.; VIANI, R. C.; KHOURI, S.; GONTIJO, V.; KREBS, V. L. Infecção Hospitalar Fúngica: Experiência em Hospitais Público de São Paulo. **Prática Hospitalar**, n. 52, s/n, p. 63-66, 2007.

PEDREIRA, M. L. G.; KUSAHARA, D.M.; CARVALHO, W. B.; NUÑES, S. C.; PETERLINE, M. A. Oral Care Interventions and Oropharyngeal Colonization in Children Receiving Mechanical Ventilation. **J Crit Care.**, v.18, n.4, p.319-328, jul. 2009.

PEIXOTO, J. V.; M. G.; NASCIMENTO, R.T.L.; MOREIRA, V.V.; KASHIWABARA, T.G.B. Candidiase-uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v.8, n.2,p.75-82,Jun-Ago., 2014.

PERDICARIS, S.; VLACHOGIANNI, T.; VALAVANIDIS, A. Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals. **Natural Products & Chemistry Research**, v.1, p.114 ,2013.

PIRES, J, R.; ROSSA JUNIOR, C.; PIZZOLITTO, A.C. In vitro antimicrobial efficiency of a mouthwash containing triclosan/gantrez and sodium bicarbonate. *Brazilian Oral Research*, São Paulo, v.21, n.4, p.342-347, oct.-dec., 2007.

PEREIRA, A.G.; NEVES, A.M.; TRINDADE, A.C. Imunologia da Cárie Dentária. **Acta Med Port.** v.23, n. 4, p.663-668, 2010.

POWDERLY, W.G.; ROBINSON, K.; KEATH, E.J. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. **J. Infect. Dis.**, v.168, s/n, p.463-466, 1993.

RAMOS, R.C; D' ARMAS, H.; AMARO, M.; MARTÍNEZ, R. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de seis esponjas marinas de la Bahía de Mochima, Venezuela. **Cuadernos de Investigación UNED**, v.7, n.2, p.225-232, December, 2015.

REIS, J.; MELO, P.A Cárie dentária, uma doença infecciosa. **Revista Portuguesa de Saúde Pública.** v. 21, n. 1, Jan-Jun, 2003.

REGEZI JA, SCIUBBA JJ. **Patologia Bucal Correlações Clinicopatológicas.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.512, 2008.

ROLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **J Dent Res.** v.54, p.57-62,1975.

ROSSI, T.; LOZOVY, M.A.B.; SILVA, R.V.; FERNANDES, E.V.; GERALDINO, T.H., COSTA, C.I.; SARIDAKIS, H.O.; WATANABE, M.A.E.; FELIPE,I. Interações entre candida albicans e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan. /Jun. 2011.

Secretaria de Estado da Saúde e do Bem-estar social. **Resolução Estadual n.8, de 11 de março de 1987.** Disciplina as instalações, serviços de laboratório de análises clínica e postos de coleta de material. Disponível em:http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/estadual_resolucao/87rpp08.pdf >

SAMARANAYAKE, L. **Fundamentos de Microbiologia e Imunologia na Odontologia**. Trad. 4ª Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, P.382, 2013.

SEMENOFF, T.A.D.V.; SEMENOFF-SEGUNDO, A.; BIASOLLI, E.R. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Odonto Ciências**. Porto Alegre, v.23, n.4, p.351-354, 2008.

SEGUNDO, A.S. et al. Efetividade do gluconato de clorexidina a 0,12% e do digluconato de clorexidina a 2% adquiridos em diferentes dentais e farmácias na cidade de Cuiabá, sobre *Candida albicans*. **Revista periodontia**. Rio de Janeiro, v.7, n.1, p.5-41, mar.2007.

SILVA, N.; CARNEIRO, R.; FECHINE, J.; SOBRAL, M.; CUNHA E.; FILGUEIRAS, P.; CEZAR, L.; SILVA, C.; BARBOSA, J. Brominated Compounds from Marine Sponges of the. **Research Journal of the Costa Rican Distance Education University**, v. 7, n.2, p. 225-232, Diciembre, 2015.

SIPKEMA, D.; FRANSSEN, M.C.; OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Marine sponges as pharmacy. **Mar Biotechnol**, v. 7, p. 142-162, NY, 2005.

SHADY, N.H.; EL-HOSSARY, E.M.; FOUAD, M.A.; GULDER, T.A.M.; ABDELMOHSEN, U.R. Bioatividade Natural Products of Marine Sponges from the Genus *Hyrtios*. **Molecules**, v. 22, n.5, p.11, may, 2017.

SHEEN, E.; OWENS, J.; ADDY, M. The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetylpyridinium chloride to produce staining in vitro: a possible predictor of inactivation. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v.28, n.1, p.46, Jan., 2001.

SHIMOGAWA, H.; KURIBAYASHI, S.; TERUYA, T.; SUENAGA, K.; KIGOSH, H. Cinachyramine, the novel alkaloid possessing a hydrazone and two amines from *Cinachyrella* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 9, p. 1409-1411, 2006.

SOUZA, A.F.; GUIMARAES, A.C.; FERREIRA, E.F. Avaliação da implementação de um novo protocolo de higiene bucal em um centro de terapia intensiva para prevenção de pneumonia associada a ventilação mecânica. **Rev. Min. Enferm.** v.17, n.1, p.177-184, 2013.

STANDARDS, N.C. F.C.L. Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Approved Standard : National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

STRAMANDINOLI, R. T.; SOUZA, P. H. C.; WESTPHALEN, F.H.; BISINELLI, J. C.; IGNÁCIO, S. A.; YURGEL, L.S.; Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **Rev Sul-Bras Odontol.** v. 7, n.1, p. 66-72, 2010.

SZITENBERG, E.; LEONTINE, B. S.; VARGAS, C. C.; JÚLIO, E.; FERNANDEZ, N. SANTODOMINGO, G.; WÖRHEIDE, M.; ILAN, M.; KELLY, D.; HUCHON. Phylogeny

of Tetillidae (Porifera, Demospongiae, Spirophorida) based on three molecular markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 67, p. 509–519,2013.

TORRES, B.L.B. Tratamento odontológico para pacientes submetidos a radioterapia em região de cabeça e pescoço: Uma revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - **Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 69 f, 2011.

TORRES, Y.R.; BERLINCK, R.G.; NASCIMENTO, G.; FORTIERS, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloids toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Toxicon**, v.40, p. 91-885,2002.

TOUATI, I.; CHAIEB, K.; BAKHROUF, A.; GADDOUR, K. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from Tunisian coast. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 17, p. 183-187,2007.

TRENTIN, M.S.; SCORTEGAGNA, S.A.; DALBELO, M. S.; BITTENCOURT, M.E.; LINDEN, M.S.S.; ARGENTA, S.; CASILLI, M., NEVES, M.; CARLI, J.P.; OLIVEIRA, C. A. Doença periodontal e fatores de risco em pacientes HIV positivos. **RFO**, v. 12, n. 3, p. 49-55, setembro/dezembro 2007.

WATANABE, E.; NASCIMENTO, A.P.; TANOMARU, M. J. G.; RAZABONI, A. M.; ANDRADE, D.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of different 1% chlorhexidine varnish regimens on biochemical composition of the dental biofilm. **Rev. Odonto Cienc.**, v. 26, n.1, p.30-34, 2011.

ZANATTA, F.B.; ROSING, C.K. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**. v.2, n.1, p.35-43, 2007.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, São Paulo, v.63, p.136-146, 2004.