

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

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon nardus E DO FITOCONSTITUINTE
CITRONELAL SOBRE ESPÉCIES DE *Candida*
ENVOLVIDAS COM INFECÇÕES PERI-
IMPLANTARES**

Leonardo Antunes Trindade

SAPIENTIA AEDIFICAT

2014

LEONARDO ANTUNES TRINDADE

ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon nardus* E DO FITOCONSTITUINTE CITRONELAL SOBRE CEPAS DE *Candida* ENVOLVIDAS COM INFECÇÕES PERI-IMPLANTARES

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 Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

João Pessoa

2014

T833a Trindade, Leonardo Antunes.
Atividade biológica do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e do fitoconstituente citronelal sobre cepas de *Candida* envolvidas com infecções peri-implantares / Leonardo Antunes Trindade.-- João Pessoa, 2014.
54f.
Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima
Coorientador: Ricardo Dias de Castro
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Odontologia. 2. Estomatologia. 3. *Cymbopogon*.
4. Citronela. 5. *Candida*. 6. Implante dentário. 7. *Cover screw*.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

LEONARDO ANTUNES TRINDADE

ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon nardus* E DO FITOCONSTITUINTE CITRONELAL SOBRE CEPAS DE *Candida* ENVOLVIDAS COM INFECÇÕES PERI-IMPLANTARES

Banca Examinadora

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora – UFPB

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Co-Orientador - UFPB

Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo
Examinador – UFPB

Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti
Examinador - UEPB

DEDICATÓRIA

As minhas avós **Laurentina de Almeida Trindade** (*in memoriam*) e **Deolinda Rosalina** (*in memoriam*) que sempre estarão em meus pensamentos e orações e apesar da distância continuam torcendo por mim.

Aos meus pais **Franklin e Maria Dolores** pela honestidade, caráter, amor e carinho. Agradeço por tudo que me ensinaram, pelos conselhos, pela amizade, pelo convívio, por estarem sempre presentes em minha vida e pelo que fizeram e tem feito para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu irmão **Bruno** pela amizade, amor e conselhos na vida pessoal e profissional.

A minha noiva **Ingrid** pelo seu amor, esforço, dedicação profissional, incentivo aos estudos e por me ensinar, com nossas semelhanças e diferenças, a dividir, amar e compreender...

A minha segunda família **Maria José, Cristóvão, Ivna e Irlen** pelo carinho, amor, paciência e pelo exemplo de família guerreira e unida.

Aos meus amigos “irmãos” **Daniel, Kaio, Rômulo e Thiago** pela amizade e companheirismo em todos os momentos importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por minha existência e por colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

A minha orientadora **Edeltrudes de Oliveira Lima** pelos ensinamentos, confiança, dedicação, amizade e profissionalismo.

Ao meu co-orientador **Ricardo Dias de Castro** pelos ensinamentos, paciência, amizade, incentivo e muitas contribuições necessárias para realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação pela experiência e ensinamentos repassados.

A todos os amigos do mestrado, em especial, **Igor, Julyana, Sabrina, Maria Auxiliadora, Palmira, Ramon, Laudenice, Manuela, Ilzeny Patrícia e Rebeca** pelo convívio, ensinamentos e pela amizade que construímos durante esses anos.

Aos amigos **Marcos, Rodrigo, Louise, Ingrid, Marianne, Gabriela e Julyana** do grupo de pesquisa **NEOP** pelo convívio e ensinamentos que foram essenciais para o meu crescimento profissional.

A **DSP BIOMEDICAL®**, pela disponibilização dos implantes dentários e *cover screws*.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo incentivo financeiro por meio da bolsa de estudo.

*“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin*

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e do fitoconstituente citronelal sobre cepas de *Candida*, verificando a possível inibição da aderência aos implantes dentários e *cover screws*. Inicialmente, foi realizado uma triagem por meio da técnica de disco-difusão em Agar Sabouraud Dextrose (ASD), para os óleos essenciais de *Cinnamomum camphora* (Cânfora Branca), *Melissa officinalis* (Erva Cidreira), *Ocimum basilicum* (Manjericão) e *Cymbopogon nardus* (Citronela), bem como dos fitoconstituintes alfa pineno, citral, citronelal e carvacrol. Após a triagem, o óleo essencial de *C. nardus* e o citronelal foram selecionados por terem apresentado expressiva atividade antifúngica. Em seguida, o óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (GC-MS). Posteriormente, foram determinadas a CIM e CFM do óleo essencial e citronelal frente a 12 cepas de *Candida* e realizados testes de inibição da aderência aos implantes dentários e *cover screws*, utilizando-se a CIM das substâncias avaliadas, seguida de análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Os ensaios foram realizados em triplicata e a nistatina e clorexidina foram utilizadas como controle positivo. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 4. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ao nível de confiança de 95%. A análise por GC-MS do óleo essencial permitiu a identificação do terpenoide citronelal como substância majoritária. A CIM do óleo essencial, citronelal, clorexidina e nistatina capaz de inibir 100% das cepas foi 64 µg/mL; 512 µg/mL; 64 µg/mL; 32 µg/mL, respectivamente. O óleo essencial inibiu a aderência de *C. albicans* nos implantes dentários e *cover screws* ($p < 0,001$). O citronelal inibiu apenas o crescimento da cepa nos implantes dentários ($p < 0,001$), não apresentando resultados significantes nos *cover screws* ($p > 0,05$) em relação ao controle de crescimento. Conclui-se que o óleo essencial de *C. nardus* e citronelal possuem atividade antifúngica e são capazes de inibir a aderência *in vitro* de *C. albicans*.

Palavras-chave: *Cymbopogon*, citronela, *Candida*, implante dentário, *cover screw*

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the biological activity of the essential oil of *Cymbopogon nardus* and citronellal phytochemical on *Candida* strains, checking the possible inhibition of adhesion to dental implants and *cover screws*. Initially, a screening was performed by the disk diffusion technique in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for the essential oils of *Cinnamomum camphora* (White Camphor), *Melissa officinalis* (Lemon Balm), *Ocimum basilicum* (Basil) and *Cymbopogon nardus* (citronella), as well as phytochemicals alpha pinene, citral, citronellal and carvacrol. After screening, the essential oil of *C. nardus* and citronellal were selected because they displayed significant antifungal activity. Then, essential oil was analyzed by Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Subsequently, were determined MIC and MFC of essential oil and citronellal against 12 strains of *Candida* and tests of inhibition of adhesion to dental implants and *cover screws*, using the MIC of substances evaluated, followed by analysis on a Scanning Electron Microscope (SEM). Assays were performed in triplicate and chlorhexidine and nystatin were used as positive control. The data were analyzed on the software GraphPad Prism 4. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test was carried out, with a confidence interval of 95%. The GC-MS analysis of the essential oil identified the major substance as citronellal terpenoid. The essential oil, citronellal, chlorhexidine and nystatin able to inhibit 100% of the strains was 64 µg/mL, 512 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, respectively. The essential oil inhibited the adhesion of *C. albicans* in the dental implants and *cover screws* ($p < 0.001$). Citronellal only inhibited the growth of the strain in dental implants ($p < 0.001$) with no significant results in the *cover screws* ($p > 0.05$) compared to the growth control. We conclude that the essential oil of *C. nardus* and citronellal have antifungal activity and are able to inhibit the *in vitro* adherence of *C. albicans*.

Keywords: *Cymbopogon*, citronellal, *Candida*, dental implant

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

eV – Elétron-volt

GC-MS – Gas chromatography–mass spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa)

HE – Hexágono externo

Kv – Quilovolt

m – metro

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

min. – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

NaCl – Cloreto de sódio

pH – Potencial de hidrogênio

ppm – Partículas por milhão

SLA – Sandblasted; Large grit; Acid etching (jateada; partículas grandes; ataque ácido)

u.m.a – Unidade de massa atômica

UFC – Unidade formadora de colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

% - Porcento

°C – Grau Celsius

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO 1	16
3. CAPÍTULO 2	28
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	47
5. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Implantes dentários têm sido amplamente utilizados como suporte de próteses fixas e removíveis apresentando boa previsibilidade e alta taxa de sucesso na reabilitação oral de pacientes edentados [1-3]. Entretanto, falhas tardias pode ocorrer após a reabilitação protética, como resultado de doença peri-implantar ou sobrecarga biomecânica [4-6]. As causas desse insucesso podem estar relacionadas a fatores endógenos e exógenos. Os fatores endógenos relacionam-se ao estado geral de saúde do paciente e aos hábitos de higiene oral, os quais podem desencadear infecções peri-implantares conhecidas como peri-implantites. Em relação aos fatores exógenos pode-se apontar o tipo de material utilizado na fabricação dos implantes, sua biocompatibilidade, características superficiais e desenho do implante [7,8].

A peri-implantite é definida como uma inflamação da mucosa com a presença de supuração, sangramento e contínua perda óssea ao redor dos implantes [9]. Fatores de risco para peri-implantites incluem exposição precoce dos implantes e pobre higiene oral, resultando em acúmulo de biofilme [10] que pode se iniciar na superfície do implante tão logo ele é exposto na cavidade bucal [11,12]. A microbiota encontrada na doença peri-implantar é semelhante à encontrada na gengivite e em sítios com periodontite avançada [13], porém micro-organismos não usualmente associados com periodontites ou abscessos dentários como *Staphylococcus* e *Candida* spp. são comumente isolados de lesões peri-implantares [14].

Candida spp. tem como sítio preferencial a cavidade bucal para o desenvolvimento de infecções [15-18], estando relacionadas com seus fatores de virulência e capacidade de formação de biofilmes [18,19]. A saliva, fluido gengival, pH e os nutrientes são favoráveis aos processos de co-agregação e co-adesão entre *Candida* e outros micro-organismos, em especial as bactérias, estando associadas as principais patologias da cavidade oral, bem como a cárie dentária e a doença periodontal [19]. Outras espécies não *albicans*, como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* têm sido relacionadas a patologias como a candidose oral, no curso da infecção [20].

C. albicans é um patógeno comensal e oportunista que causa infecções normalmente em consequência de uma alteração na resposta imunológica do hospedeiro. Sua virulência está relacionada à plasticidade morfológica e capacidade de formação de biofilmes [21]. A fase inicial e essencial na patogênese da candidíase oral implica na fixação da *C. albicans* a uma superfície de acolhimento ou um dispositivo implantado, tal como as próteses e implantes dentários [22,23].

As células de levedura possuem elevado potencial de aderência aos materiais artificiais, quase da mesma maneira que para os tecidos orais [18]. Em geral, os biofilmes (bacterianos e/ou fúngicos) possuem maior resistência às defesas do hospedeiro e a terapia antimicrobiana convencional, resultando em infecções graves e persistentes [22,23]. As superfícies dos implantes proporcionam o substrato necessário para formação de biofilmes fúngicos e, portanto, pode servir como reservatório para infecção/reinfecção por *C. albicans* [24].

Para que o controle mecânico do biofilme seja bem sucedido, alguns fatores são essenciais como frequência, técnica utilizada e tempo de escovação, além da motivação e habilidade do paciente. Alguns estudos [12-14,25] afirmam que o uso de antimicrobianos (sistêmico, local ou combinado) é benéfico no tratamento de infecções peri-implantares. Entretanto, não existe até o momento um protocolo específico, apenas propostas de tratamento antimicrobiano para peri-implantite, bem como ainda existe pouca informação na literatura sobre a aderência e inibição de fungos em superfícies de implantes dentários.

A utilização de terapia antibiótica de amplo espectro e o uso de próteses dentárias mal higienizadas, associadas à hipossalivação, pode ser observada como fatores que predispõem ao aparecimento da candidose oral [26,27]. Os fármacos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas são representados pelos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e azólicos (fluconazol, itraconazol, miconazol, cetoconazol), sendo estes últimos os de primeira escolha para tratamento dessas doenças e são geralmente fungistáticos [28].

A clorexidina possui ação comprovada no combate à formação de biofilmes e apresenta um amplo espectro antimicrobiano tanto sobre bactérias quanto sobre fungos [29] e possui indicação como método químico adjuvante no tratamento da peri-implantite [30-32]. Entretanto, efeitos adversos da clorexidina, tais como:

gosto desagradável, alterações do paladar, pigmentação nos dentes e descamação oral são fatores limitantes do seu uso prolongado [33,34].

Novos agentes têm sido propostos para minimizar reações indesejadas apresentadas pelos usuários ao uso de antimicrobianos, bem como o aumento da resistência pelos micro-organismos. Essa resistência tem aumentado em função do uso indiscriminado de antimicrobianos, impulsionando investigadores a estudarem novas substâncias antimicrobianas de várias fontes, incluindo as plantas medicinais [35]. As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial e apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, continuam sendo utilizadas e, estima-se que 25 a 30% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais [36].

Dentre as substâncias obtidas a partir das plantas, destacam-se os óleos essenciais, compostos naturais e complexos, caracterizados pelo forte odor e volatilidade. São formados pelos metabólitos secundários de plantas aromáticas e apresentam cerca de dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas (20-70%) [37].

O gênero *Cymbopogon* é constituído de oitenta e cinco espécies. A espécie *Cymbopogon nardus* L. Rendle é uma planta originada do Ceilão e da Índia e pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae [38]. O óleo essencial de *C. nardus* é conhecido por apresentar características repelentes de insetos [39], antiespasmódicas, rubefacientes, estimulantes, carminativos, diaforéticos [40], antimicrobianas [41] e antifúngicas [42-44] sendo composto principalmente por monoterpenos (\pm 80%), o que inclui, principalmente, citronelal, citronelol, e geraniol [39]. Poucos estudos demonstram a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. nardus* e citronelal sobre cepas de *Candida*, especialmente em relação à inibição da aderência desses micro-organismos em superfícies de materiais. Espécies de *Candida* possuem capacidade de formação de biofilmes, condição que as tornam mais resistentes à terapia antimicrobiana convencional.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *C. nardus* e do citronelal, verificando a possível inibição da aderência aos implantes dentários e *cover screws*, sobre cepas de *Candida* envolvidas com infecções peri-implantares. Para tanto, o estudo foi dividido em dois capítulos, dando origem a dois artigos científicos.

No capítulo 1 foi investigado a possível atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Cinnamomum camphora*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon nardus*, bem como dos fitoconstituintes alfa pineno, citral, citronelal e carvacrol frente à *Candida albicans* e *Candida tropicalis* a fim de se buscar um óleo essencial e fitoconstituente com melhor atividade. Dessa forma, o óleo essencial de *C. nardus* e o citronelal foram selecionados para dar continuidade à pesquisa por apresentarem expressiva atividade frente às cepas testadas, bem como pelo citronelal ser relatado na literatura como componente majoritário do óleo essencial de *C. nardus*, o que poderia sugerir que sua atividade antifúngica seria independente do sinergismo com os outros compostos do óleo essencial. Além disso, existem poucos estudos relatando a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. nardus* e citronelal sobre espécies de *Candida*.

No capítulo 2 foi realizada a cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (GC-MS) permitindo a caracterização e identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *C. nardus*, apresentando o citronelal como componente majoritário. Posteriormente, foram determinadas a CIM e CFM do óleo essencial e citronelal frente a 12 cepas de *Candida* e realizados testes de inibição da aderência aos implantes dentários e *cover screws*, utilizando-se a CIM das substâncias avaliadas, seguida de análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Revista Brasileira de Plantas Mediciniais”

Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre cepas de *Candida*

TRINDADE, L.A.^{1*}; CASTRO, R.D.¹; OLIVEIRA, E.O.²

Programa em Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba¹,
Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Universidade Federal da Paraíba²

*Email: lat363@gmail.com

RESUMO: O presente estudo investigou a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Cinnamomum camphora*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon nardus*, bem como dos fitoconstituintes alfa pineno, citral, citronelal e carvacrol frente à *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A avaliação antifúngica dos produtos testados foi determinada por meio da técnica de disco-difusão em Agar Sabouraud Dextrose. Assim, os resultados da susceptibilidade aos produtos foram expressos em termos de tamanho de diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, padronizado e considerado na maior concentração utilizada como: menor que 9 mm, não ativo (NA); 9-14 mm, parcialmente ativo (PA); maior que 14 a 17 mm, ativo (A) e maior que 17 mm, muito ativo (MA). Os óleos essenciais e fitoconstituintes, frente às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, produziram os seguintes halos de inibição, respectivamente: *Cinnamomum camphora* (11mm; 14mm), *Melissa officinalis* (32mm; 30mm), *Ocimum basilicum* (32mm; 30mm), *Cymbopogon nardus* (15mm; 30mm), alfa pineno (35mm; 30mm), citral (32mm; 25mm), citronelal (30mm; 30mm) e carvacrol (30mm; 30mm). Conclui-se que todos os óleos essenciais e fitoconstituintes apresentaram atividade antifúngica frente às cepas testadas.

Palavras-chave: *Candida*, susceptibilidade, produtos naturais.

ABSTRACT: The present study investigated the antifungal activity of essential oils of *Cinnamomum camphora*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon nardus* as well as phytochemicals alpha pinene, citral, citronellal and carvacrol against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. The evaluation of the antifungal product tested was determined using the disk diffusion technique in Sabouraud Dextrose Agar. Thus, the results of the susceptibility of the products were expressed in terms of diameter size of inhibition zone of microbial, and patterned seen at the highest concentration used as growth: less than 9 mm, non-active (NA); 9-14 mm, partially active (PA), greater than 14-17 mm, active (A) and greater than 17 mm very active (VA) . The essential oils and phytochemicals, against the strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*, produced the following inhibition zones, respectively: *Cinnamomum camphora* (11mm; 14mm), *Melissa officinalis* (32mm; 30mm), *Ocimum basilicum* (32mm; 30mm), *Cymbopogon nardus* (15mm; 30mm), alpha pinene (35mm; 30mm), citral (32mm; 25mm), citronellal (30mm; 30mm) and carvacrol (30mm; 30mm). We conclude that all essential oils and phytochemicals showed antifungal activity against all tested strains.

keywords: *Candida*, susceptibility, natural products

INTRODUÇÃO

Candida spp. tem como sítio preferencial a cavidade bucal para o desenvolvimento de infecções, (APPLETON, 2000; SAMARANAYAKE et al., 2001; SERRANO-GRANGER et al., 2005) estando relacionadas com seus fatores de virulência e capacidade de formação de biofilmes (BLANKENSHIP, MITCHELL, 2006; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006). A saliva, fluido gengival, pH e os nutrientes são favoráveis aos processos de co-agregação e co-adesão entre *Candida* e outros micro-organismos, em especial as bactérias, estando associadas as principais patologias da cavidade oral: (1) cárie dentária; (2) doença periodontal (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006).

Outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* têm sido relacionadas a patologias como a candidose oral, no curso da infecção (CROCCO et al., 2004). O aumento na resistência aos fármacos antifúngicos, às defesas imunológicas do hospedeiro, bem como a capacidade de causar infecções estão intimamente relacionadas na habilidade de formação de biofilmes (HENRIQUES; AZEREDO; OLIVEIRA, 2004; RAMAGE et al., 2005).

A colonização por *C. albicans*, em indivíduos sadios, ocorre em 10 a 50%, sendo geralmente controlada por competições nutritivas, antagonismo competitivo da microbiota comensal e pela produção de substâncias tóxicas as quais podem interferir no mecanismo de aderência dessas leveduras às células epiteliais. A produção de ácido láctico por essas células ou a manutenção do pH salivar também são fatores limitantes da colonização dessas leveduras (LORENZO, 2004).

A utilização de terapia antibiótica de amplo espectro e o uso de próteses dentárias mal higienizadas, associadas à hipossalivação, pode ser observada como fatores que predispõem ao aparecimento da candidose oral (KURIYAMA et al., 2005; TORRES et al., 2007).

Os fármacos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas são representados pelos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e azólicos (fluconazol, itraconazol, miconazol, cetoconazol), sendo estes últimos os de primeira escolha para tratamento dessas doenças e são geralmente fungistáticos (WINGETER et al., 2007). Novos agentes têm sido propostos para minimizar as reações indesejadas associadas ao uso de antimicrobianos, bem como ao aumento da resistência pelos micro-organismos. Essa resistência vem aumentando em função do uso indiscriminado desses agentes utilizados no tratamento de doenças infecciosas, impulsionado novos estudos em busca de substâncias antimicrobianas de várias fontes, incluindo as plantas medicinais (BANSOD; RAI, 2008), as quais têm um importante papel na saúde mundial e apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, continuam sendo utilizadas (CALIXTO, 2005).

Estima-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (CALIXTO, 2005). Dentre as substâncias obtidas a partir das plantas, destacam-se os óleos essenciais,

compostos naturais e complexos, caracterizados pelo forte odor e volatilidade. São formados pelos metabólitos secundários de plantas aromáticas e apresentam cerca de dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas (20-70%) (BAKKALI et al., 2008). Os fitoconstituintes, pequenas biomoléculas orgânicas, são compostos químicos oriundos dos óleos essenciais e podem apresentar atividades biológicas se utilizados de forma isolada ou em associação a outras substâncias. Seu estudo representa uma importante possibilidade de obtenção de novos fármacos, especialmente se consideramos a possibilidade de síntese dos mesmos em laboratório, o que garante produção em larga escala (LIMA et al., 2005).

Dessa forma, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Cinnamomum camphora* (canfora branca), *Melissa officinalis* (erva cidreira), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Cymbopogon nardus* (citronela), bem como dos fitoconstituintes alfa pineno, citral, citronelal e carvacrol frente a cepas de *Candida*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os óleos essenciais foram obtidos comercialmente na Quinari Fragrâncias e Cosméticos Ltda.[®], Ponta Grossa – PR e os fitoconstituintes na Sigma-Aldrich[®], Brasil (Tabela 1). Foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* (ATCC 76645) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803) cedidas pelo Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. As amostras foram repicadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (DIFCO[®]) e incubadas em estufa a 35°C por 24-48 horas. Em seguida, foram feitas suspensões fúngicas em solução salina estéril a 0,9%, conforme suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland e ajustada para 90% de transmitância no espectrofotômetro (Leitz-photometer 340-800), para conter cerca de 10⁶ UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

TABELA 1. Óleos essenciais e fitoconstituintes (Fabricantes e número do lote)

Óleos Essenciais e fitoconstituintes	Fabricantes	Número do lote
<i>C. camphora</i>	QUINARI®	05209/F
<i>M. officinalis</i>	QUINARI®	05209/F
<i>O. basilicum</i>	QUINARI®	022186
<i>C. nardus</i>	QUINARI®	519/520
Alfa pineno	SIGMA-ALDRICH®	58296DK-389
Citral	SIGMA-ALDRICH®	S85776
Citronelal	SIGMA-ALDRICH®	11196PH-349
Carvacrol	SIGMA-ALDRICH®	S40656V

A avaliação antifúngica dos produtos testados foi determinada por meio da técnica de disco-difusão em ASD (BAUER et al., 1966). Placas de Petri contendo ASD foram semeadas por meio da técnica do esgotamento. Logo após, discos de papel de filtro com 6,0mm de diâmetro contendo 20 µL dos óleos essenciais e fitoconstituintes foram inseridos sob o meio de cultura e as placas incubadas em estufa a 35°C por 24-48 horas.

Os resultados da susceptibilidade aos produtos foram expressos pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento fúngico, sendo considerados os seguintes parâmetros: menor que 9 mm, não ativo (NA); 9-14 mm, parcialmente ativo (PA); maior que 14 a 17 mm, ativo (A) e maior que 17 mm, muito ativo (MA) (AYRES, et al., 2008).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O presente estudo realizou uma triagem da atividade antifúngica dos óleos essenciais e fitoconstituintes, a fim de avaliar a presença ou ausência de atividade antifúngica. Ostrosky et al., (2008) verificaram que o método de diluição em agar é o mais utilizado para “*screening*”, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo, entretanto, outros métodos como o da microdiluição, tem sido muito

utilizado, devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados.

Os micro-organismos selecionados para o estudo são considerados agentes etiológicos de relevância clínica, o que torna importante o seu controle. Os valores dos halos de inibição dos óleos essenciais e fitoconstituintes frente às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Valores dos halos de inibição (mm), dos óleos essenciais e fitoconstituintes frente às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Óleos Essenciais e fitoconstituintes	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Cinnamomum camphora</i>	11	14
<i>Melissa officinalis</i>	32	30
<i>Ocimum basilicum</i>	32	30
<i>Cymbopogon nardus</i>	15	30
Alfa pineno	35	30
Citral	32	25
Citronelal	30	30
Carvacrol	30	30

Os óleos essenciais e fitoconstituintes apresentaram atividade antifúngica sobre as espécies de *Candida* e foram classificados segundo Ayres et al. (2008). Frente à cepa de *C. albicans*, os óleos essenciais *M. officinalis*, *O. basilicum*, bem como os fitoconstituintes alfa pineno, citral, citronelal e carvacrol foram considerados muito ativos. Já os óleos essenciais de *C. nardus* e *C. camphora* foram considerados como ativo e parcialmente ativo, respectivamente. Com relação a *C. tropicalis* os óleos essenciais de *M. officinalis*, *O. basilicum* e *C. nardus*, bem como os fitoconstituintes alfa pineno, citronelal, carvacrol e citral foram muito ativos. Entretanto, o óleo essencial de *C. camphora* foi parcialmente ativo.

A atividade antifúngica de vários óleos essenciais tem sido testada *in vitro* e *in vivo* apresentando resultados significativos. Dutta et al., (2007) avaliaram a

atividade antifúngica do óleo essencial de *C. camphora* frente a *C. albicans* e o mesmo apresentou halo de inibição de 10.67 mm. Da mesma forma, Barbaro e Stelato, (2009), Almeida et al., (2010) e Cavalcanti et al., (2011) avaliaram a atividade antifúngica do *O. basilicum* apresentando valores de halos de inibição que variaram de 27 a 35 mm para cepas de *C. albicans*. Em outro estudo, Keskin, Oskay e Oskay, (2010) analisaram atividade antifúngica da *M. officinalis* e apresentaram halo de inibição de 16 mm. O óleo essencial de *C. nardus* apresenta atividade antifúngica, (ZORE et al., 2011; LI et al., 2013) porém suas atividades biológicas frente a espécies de *Candida* ainda são pouco estudadas.

Os resultados supracitados estão de acordo com os achados do presente estudo indicando a expressiva atividade antifúngica dessas espécies que pode estar relacionado ao sinergismo existente entre os compostos do óleo essencial, proporcionando uma melhor atividade biológica (WILLIAMSON, 2001). Os mecanismos de ação dos óleos essenciais parecem ser predominantemente na membrana celular fúngica, interrompendo sua estrutura e ocasionando a morte celular; bloqueando a síntese da membrana; inibição da germinação de esporos, proliferação de fungos e respiração celular (HARRIS, 2002). Devido à elevada volatilidade e lipofilidade dos óleos essenciais, eles penetram prontamente na membrana celular e exercem seu efeito biológico (INOUE, 2003).

O presente estudo demonstrou que os fitoconstituintes alfa-pineno, citral, citronelal e carvacrol apresentaram atividade antifúngica frente às cepas de *Candida*, estando de acordo com os estudos relatados na literatura (LIMA et al., 2005; BOTELHO et al., 2007; SILVA et al., 2008; ZORE et al., 2011; LI et al., 2013). Esses fitoconstituintes são pequenas biomoléculas orgânicas, geralmente hidrofóbicas, designadas como antibióticos naturais, que exercem sua ação antimicrobiana possivelmente pela ruptura da membrana citoplasmática (HELANDER; ALAKOMI; LATVA-KALA, 1998; BRULL, COOTE, 1999).

Com o surgimento de micro-organismos resistentes à terapia convencional, torna-se importante o estudo de novos agentes antimicrobianos (PENNA et al., 2001). Diante disso, os óleos essenciais e fitoconstituintes estão em constante investigação e tem demonstrado potencial atividade antimicrobiana (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). Novos testes *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados a fim de investigar os possíveis efeitos toxicológicos e mecanismos de ação dos óleos essenciais relacionando a estrutura-atividade dos fitoconstituintes presentes óleo

a fim de se obter formulações de um produto fitoterápico como alternativa de tratamento de infecções orais causadas por fungos. Diante dos resultados, conclui-se que todos os óleos essenciais e fitoconstituintes apresentaram atividade antifúngica frente às cepas testadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y. W.; VIANA, W. P.; LIMA, E. O. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.14, n.4, p.51-6, 2010

APPLETON, S. S. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics and treatment. **Journal of the California Dental Association**. v. 28, n. 12 , p. 942-48, 2000.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Coperniciaprunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 1, p. 90-7, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p. 446-75, 2008.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 81-8, 2008.

BARBARO, N. R.; STELATO, M. M. Atividade anti-*candida* de óleos essenciais de plantas utilizadas na culinária. **Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas**. 2009.

BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v.45, n.3, p. 493-96, 1966.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**. v. 9, n. 6, p. 588-94, 2006.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against iral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 3, p. 349-56, 2007.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, p. 1-17, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnofarmacology**, v.100, p.131-34. 2005.

CAVALCANTI, Y. W.; PÉREZ, A. L. A. L.; XAVIER, G. D. R.; ALMEIDA, L. F. D. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 40, n. 5, p. 208-14, 2011.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, p. 739-87, 1991.

CROCCO, E.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidiases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 79, p. 689-97, 2004.

DUTTA, B. K.; KARMAKAR, S.; NAGLOT, A.; AICH, J. C.; BEGAM, M. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. **Mycoses**, v. 50, n. 2, p. 121-24, 2007.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, Londres, n. 11, p. 137-47, 2000.

HARRIS R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**. v. 12, p. 83-91, 2002.

HELANDER, L.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-positive bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, p.3590-3595, 1998.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. **Biointerfaces**. v. 33, n. 1, p. 235-41, 2004.

INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). **International Journal of Aromatherapy**. v. 13, p. 95-107, 2003.

KESKIN, D. D.; OSKAY, D.; OSKAY, M. Antimicrobial activity of selected plant spices marketed in the West Anatolia. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 12, n. 6, p. 916-920, 2010.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; BAGG, J. COULTER, W. A.; READY, D, LEWIS, M. A. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiology and Immunology**. v. 20, n. 6, p. 349-53, 2005.

LI, W. R.; SHI, Q. S.; OUYANG, Y. S.; CHEN, Y. B.; DUAN, S. S. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 97, n.16, p. 7483-92, 2013.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; FARIAS, N. P.; NAVARRO, D. F. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005.

LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-07, Abr/Jun. 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 77, p. 37-40, 2001.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**. v. 4, n. 4, p. 633-38, 2005.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P.; POW, E. H. N.; BEENA, V. T.; YEUNG, K. W. S. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n.9, p. 3296-302, 2001.

SERRANO-GRANGER, C.; CERERO-LAPIEDRA, R.; CAMPO-TRAPERO, J.; DEL RIO-HIGHSMITH, J. *In vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. **The International Journal of Prosthodontics**. v. 18, n. 5, p. 392-98, 2005.

SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity of the Lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 12, n. 1, p. 63-66, 2008.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Archives of Oral Biology**. v. 51, n. 1, p. 672-80, 2006.

TORRES, S. R.; PEIXOTO, C. B.; CALDAS, D. M.; AKITI, T.; BARREIROS, M. G. C.; UZEDA, M.; NUCCI, M. prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. **Brazilian Oral Research**. v. 21, n. 2, p. 182-87, 2007.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.401-9, 2001.

WINGETER, M. A; GUILHERMETTI, E; SHINOBU, C. S; TAKAKI, I; SVIDZINSKI, T. I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-6, 2007.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**. v.18, p.1181-1190, 2011.

3. CAPÍTULO 2

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Clinical Oral Investigations”

INHIBITION OF ADHERENCE OF *C. albicans* TO DENTAL IMPLANTS AND COVER SCREWS BY *Cymbopogon nardus* ESSENTIAL OIL AND CITRONELLAL

Leonardo Antunes Trindade^{1*}, Julyana de Araújo Oliveira¹, Ricardo Dias de Castro¹, Edeltrudes de Oliveira Lima²

¹ Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, 58.035-260 João Pessoa, PB, Brazil

²Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58.051-900, João Pessoa, PB, Brazil

*[E-mail: lat363@gmail.com](mailto:lat363@gmail.com)

ABSTRACT

Objective: This study investigated the biological activity of the essential oil from *Cymbopogon nardus* and of the phytoconstituent citronellal on *Candida* strains as to the inhibition of adherence to dental implants and cover screws. **Material and Methods:** The essential oil was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and had its MIC and MFC determined against 12 strains of *Candida*. Then, tests of inhibition of adherence to the dental implants and cover screws were carried out using the MIC of the substances, followed by scanning electron microscopy analysis. Nystatin and chlorhexidine were used as positive controls, and experiments were performed in triplicate. **Results:** The analysis by GC-MS of the essential oil identified citronellal as the major compound. The MICs of the essential oil, citronellal, chlorhexidine and nystatin – able to inhibit 100% of the strains – was found to be 64 µg/ml, 512 µg/ml, 64 µg/ml, and 32 µg/ml, respectively. The essential oil significantly inhibited the adherence of *C. albicans* to the dental implants and cover screws ($p < 0.001$). Citronellal inhibited the yeast growth on the dental implants ($p < 0.001$), but no significant results were found for

the cover screws ($p>0.05$) compared to the growth control. **Conclusion:** The essential oil and citronellal have proven antifungal activity and are able to inhibit the *in vitro* adherence of *C. albicans*. **Clinical Relevance:** There has been a search for alternative natural products-containing formulations that should be effective in inhibiting adherence of yeasts to the surfaces of materials and also able to treat oral fungal infections.

Key-words: *Cymbopogon*, citronellal, *Candida*, dental implant, cover screw

INTRODUCTION

The use of dental implants has become an alternative in the rehabilitation of edentulous patients, with a success rate of approximately 96%. In spite of that, a considerable number of implant failures occurs throughout the years [1]. The causes of the failures may be related to endogenous and exogenous factors. Endogenous factors include those affecting the patient's general health and oral hygiene habits, which can trigger peri-implant infections known as peri-implantitis. Exogenous factors, in turn, are related to the type of material used in the manufacture of implants, biocompatibility, surface features and implant design [2,3].

Peri-implantitis is defined as an inflammation of the mucosa with the presence of suppuration, bleeding and continuous bone loss around the implants [4]. Risk factors for peri-implantitis include early exposure of implants and poor oral hygiene, resulting in accumulation of biofilm [5] that can be initiated on the surface of the implant as soon as it is exposed in the oral cavity [6,7]. The microbiota found in the peri-implant disease is similar to that found in sites with gingivitis and advanced periodontitis [8]. Despite this, microorganisms not usually associated with periodontitis or dental abscesses, such as *Staphylococcus* and *Candida* spp., are commonly isolated from peri-implant lesions [9].

In general, bacterial and/or fungal biofilms have greater resistance to host defenses and to conventional antimicrobial therapy, resulting in serious and persistent infections [10,11]. There is little information in the literature about the

adherence and inhibition of yeasts on the surfaces of dental implants and cover screws. As the surfaces of the implants provide the substrate necessary for formation of fungal biofilms, they can serve as a reservoir for infection/reinfection by *C. albicans* [12].

C. albicans is a commensal and opportunistic pathogen that causes infections usually as a result of a change in the host immune response. Its virulence is attributed to morphological plasticity and ability to form biofilms [13]. The early and essential step in the pathogenesis of oral candidiasis involves the attachment of *C. albicans* to a receiving surface or implanted device, such as prostheses and dental implants [10,11]. In general, yeast cells have a high potential for adherence to artificial materials, in much the same way as to the oral tissues [14].

Certain factors are essential to make the mechanical control of biofilm successful, for instance, frequency, technique and brushing time, in addition to patient's motivation and performance. Some studies [7-9,15] point out that the use of antimicrobials (systemic, local or combined) is beneficial in the treatment of peri-implant infections; however, there is not a specific protocol so far, but only proposals addressing the antimicrobial treatment of peri-implantitis.

Chlorhexidine is proven to act upon biofilm formation with a broad antimicrobial spectrum against both bacteria and fungi [16]. As such, it is indicated as adjunctive chemical method for the treatment of peri-implantitis [17-19]. However, adverse effects of chlorhexidine, such as unpleasant taste, taste changes, pigmentation of teeth and oral desquamation, are factors limiting its prolonged use [20,21].

New agents have been proposed in order to minimize unwanted reactions presented by users with the use of antimicrobials, as well as increased resistance by microorganisms. Microbial resistance levels have been increasing due to the indiscriminate use of antimicrobials, which is driving researchers to study new antimicrobial substances from various sources, including medicinal plants [22]. Medicinal plants play an important role in global health and continue to be used despite the great advances observed in modern medicine. It is estimated that 25-30% of all drugs considered as therapeutic agents are derived from natural products [23].

Among the substances obtained from plants, the essential oils stand out as natural, complex compounds characterized by strong odor and volatility. They are produced by aromatic plants as secondary metabolites and have about two or three major compounds at relatively high concentrations (20-70%) [24]. Thus, the present study aimed to evaluate the inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological tests were performed in the Mycology Laboratory of the Department of Pharmaceutical Sciences, Center for Health Sciences, and Scanning Electron Microscopy analysis was performed at the Technology Center, Federal University of Paraíba (UFPB).

The dental implants DSP BIOMEDICAL[®] OSTEOFIT HE 4.1 x 11.5mm SLA ZIRCON[®] and the cover screws DSP BIOMEDICAL[®] were used in this study, as well as *C. nardus* essential oil (QUINARI[®]) and the phytoconstituent citronellal (SIGMA-ALDRICHT[®]). In order to investigate the biological activity of the products, the following clinical and collection strains were used: *C. albicans* (ATCC 76485); *C. albicans* (ATCC 76645); *C. albicans* (LM P20); *C. albicans* (LM 62); *C. albicans* (LM 122); *C. albicans* (LM 108); *C. albicans* (LM 86); *C. albicans* (LM 111); *C. tropicalis* (LM 45); *C. tropicalis* (ATCC 13803); *C. tropicalis* (LM 14); and *C. tropicalis* (LM 20).

Nystatin (SIGMA-ALDRICHT[®]) and chlorhexidine (RIOQUÍMICA[®]) were used as positive controls in the tests of antimicrobial susceptibility. The culture media used were RPMI-1640 (HIMEDIA[®]), Sabouraud Dextrose Broth (SDB) and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (DIFCO[®]), which were prepared according to the manufacturers' recommendation.

For the preparation of the inoculum, the selected strain was maintained in SDA for 24-48 hours at 35 °C and subsequently standardized in sterile saline solution using a suspension of barium sulfate n. 0.5 of the McFarland scale. After being stirred with the aid of a Vortex device (FANEM) for 2 minutes, the suspension was adjusted to 90 % transmittance on a spectrophotometer (LEITZ-PHOTOMETER 340-800) to contain approximately 10⁶ CFU/ml [25-27].

Chromatography and mass spectrometry

The compounds were identified using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (SHIMADZU GC-MS-QP5050A) with capillary column (J & W SCIENTIFIC[®]) and a stationary phase of 5% phenyl and 95% dimethylpolysiloxane measuring 30 m length, 0.25 mm inner diameter and 0.25 mm film thick. The initial temperature program was 60 °C to 240 °C (3°C/min). The programming time of the run was 60 minutes and the injector oven temperature was 250 °C. Helium was used as carrier gas (mobile phase) at a flow rate of 1.0 ml/min with a 1:20 split ratio and injection volume of 1 µl.

The ionization of the components was performed by electron impact at 70 eV, using a 1.25 kV detector. The spectrometer was operated in SCAN mode, scanning a range of masses from 40 to 500 a.m.u (atomic mass unit). The ion source temperature was 250 °C, and the compounds were identified by comparing their mass spectra with those existing in the equipment database (MIST library, 2008).

The essential oil sample was injected at a concentration of 2 ppm, and hexane was used as solvent. Analyses of the chromatogram and mass spectra were performed using the equipment library, and the integration parameters used were *width*: 3 and *slope*: 2000.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of MIC of the essential oil, phytoconstituent, nystatin and chlorhexidine was performed by the microdilution technique [25,26]. Initially, 100 µL of RPMI-1640 culture medium were added to the wells of the plate. Then 100 µL of the experimental substances were also added to the wells at the concentration of 1,024 µg/ml, and both the medium and the sample were homogenized. Subsequently, the sample was serially diluted by transferring an aliquot of 100 µL from the first well to the following ones. The concentrations ranged from 1024 to 8 µg/ml. Aliquots of 10 µl of the inoculum were dispensed into the wells of each column. In parallel, controls of strain viability and susceptibility to nystatin and chlorhexidine were also carried out using the same technique. Tests were performed in triplicate and plates were incubated at 35 °C for 24-48 hours.

The reading for MIC determination was performed by the visual method, taking into consideration whether or not there was formation of cell clusters at the bottom of the wells. As such, MIC was considered as the lowest concentration of the test product capable of producing visible growth inhibition of yeast strains used in microbiological assays [28].

Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

After determining the MIC, the content of the wells corresponding to the inhibitory and two higher concentrations (MIC, MICx2 and MICx4) as well as that of the positive controls, was subcultured on SDA plates. The reading of MFC was based on the growth of the controls after 24-48 hours of incubation at 35 °C. MFC was considered as the lowest concentration of the test product that hampered visible growth in the subculture. Tests were performed in triplicate [29].

Inhibition of fungal adherence to dental implants and cover screws

The strain of *C. albicans* (ATCC 76645) was used in the test of inhibition of adherence. The strain was maintained in SDA, incubated at 35°C for 24-48 hours. Tests were performed in triplicate. The implants and cover screws were placed individually in glass vials containing 1 ml of SDB, 100 µl of yeast suspension (10^6 CFU/ml) and 1 ml of the test product at MIC. Then, the vials were incubated at 35°C for 24-48 hours.

Both the implants (n=3) and cover screws (n=3) were randomly allocated into five groups: (A) growth control; (B) *Cymbopogon nardus*; (C) citronellal; (D) nystatin; and (E) chlorhexidine, totalizing 15 dental implants and 15 cover screws. After the incubation period (24-48 hours), the materials were washed with 1 ml of sterile distilled water and placed in sterile vials containing 5 ml of saline solution (0.85 % NaCl). Then the vials were stirred in a Vortex apparatus for 60 seconds. After this procedure, 10 µl of the solution were seeded on Petri dishes containing SDA, which were incubated at 35°C for 24-48 hours. Ultimately, the counting of CFU/ml was made [30].

Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis

In order to conduct the SEM analysis, baseline micrographs of the surfaces of one dental implant and one cover screw were taken prior to incubation of the microorganisms. To allow the adherence, 5 dental implants and 5 cover screws were individually placed in sterile vials containing 1 ml of SDB, 0.1 ml of yeast suspension (10^6 CFU/ml), and 1.0 ml of the test products at MIC (groups B, C, D and E). Then, the vials were incubated at 35 °C for 24-48 hours. In group (A), the vials contained only 1.0 ml of SDB and 0.1 ml of yeast suspension (10^6 CFU/ml).

After the incubation period, the materials were removed from the vials and underwent metallization with gold plasma (Emitech K550x[®]). Posteriorly, microbial adherence was visualized under a scanning electron microscope (LEO 1430[®]).

Statistical analysis

The data were analyzed on the software GraphPad Prism 4. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test was carried out, with a confidence interval of 95 %.

RESULTS

Chromatographic profile and identification of compounds

The analysis by gas chromatography couple to mass spectrometry (GC-MS) allowed the characterization of *C. nardus* essential oil and identification of compounds based on information of the retention time and molecular weight. Additionally, the compounds were quantified according to the peak areas (Table1). The data were compared to the library available in the chromatographer.

Table 1 Characterization of *C. nardus* essential oil by GC-MS.

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	8.892	8.830	8.990	349264	3.17	Limonene	68.10
2	9.226	9.160	9.395	856389	7.78	Piperidine <1-methyl->	99.10
3	11.581	11.515	11.640	52458	0.48	Linalool	71.10
4	13.554	13.490	13.655	95429	0.87	Isosopulegol	41.10
5	13.889	13.765	13.995	4157403	37.75	Citronellal	41.10
6	17.183	17.085	17.285	1572018	14.27	Citronellol	41.10
7	18.380	18.250	18.495	2075063	18.84	Geraniol	69.10
8	19.082	19.015	19.135	45593	0.41	Geranial	69.10
9	22.698	22.615	22.815	365114	3.31	Citronellyl acetate	81.10
10	22.973	22.900	23.070	70762	0.64	Eugenol	164.10
11	24.047	23.960	24.125	270668	2.46	Neryl acetate	69.10
12	24.468	24.385	24.545	212422	1.93	Elemene <beta->	93.10
13	28.311	28.220	28.390	114515	1.04	Cadinene <gamma->	161.15
14	29.111	29.030	29.190	52993	0.48	Muurolene <alpha->	105.10
15	29.690	29.610	29.765	59400	0.54	Cadinene <gamma->	161.20
16	30.065	29.975	30.165	188826	1.71	Cadinene <delta->	161.20
17	31.107	31.020	31.210	285007	2.59	Elemol <alpha->	93.10
18	32.194	32.115	32.305	121511	1.10	Muurolene <gamma->	161.20
19	35.328	35.245	35.405	69435	0.63	Cadin-4-em-10-ol	161.20
				11014270	100.00		

The terpenoid citronellal was found to be the major compound (37.75%), followed by geraniol (18.84%) and citronellol (14.27%).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

The results of MIC and MFC of *C. nardus* essential oil, citronellal, chlorhexidine and nystatin, expressed as µg/ml, are shown in Table 2.

Table 2 MIC and MFC of the products tested against strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*. Values are expressed as µg/ml.

Strains	<i>C. nardus</i>		Citronellal		Chlorhexidine		Nystatin	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	64	128	256	512	64	128	32	128
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	32	32	16	16	32	32	8	8
<i>C. albicans</i> LM P20	32	32	256	256	32	32	8	8
<i>C. albicans</i> LM 122	32	32	512	1024	64	64	8	8
<i>C. albicans</i> LM 108	64	64	512	512	64	64	8	8
<i>C. albicans</i> LM 86	64	64	512	1024	64	128	8	8
<i>C. albicans</i> LM 111	32	32	256	256	64	128	8	8
<i>C. albicans</i> LM 62	32	128	16	64	64	256	8	32
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	32	32	128	128	8	8	8	8
<i>C. tropicalis</i> LM 45	32	32	256	256	64	64	8	16
<i>C. tropicalis</i> LM 14	32	32	256	256	64	128	16	64
<i>C. tropicalis</i> LM 20	32	32	256	512	64	64	16	16

Inhibition of fungal adherence to the dental implants and cover screws

The test of inhibition of adherence to the dental implants (Figure 1) indicated that the experimental substances evaluated, as well as nystatin and chlorhexidine, were able to inhibit fungal growth, with a reduction in the number of colony-forming units. All substances showed statistically significant results compared to the growth control ($p < 0.001$), but with no statistical difference when compared between each other ($p > 0.05$). As to the inhibition of adherence to the cover screws (Figure 2), *C. nardus* essential oil, nystatin and chlorhexidine also showed statistically significant results when compared to the growth control ($p < 0.001$), with no significant difference when compared between each other ($p >$

0.05). Citronellal was not effective in inhibiting adherence to the cover screws, with results similar to those of the growth control.

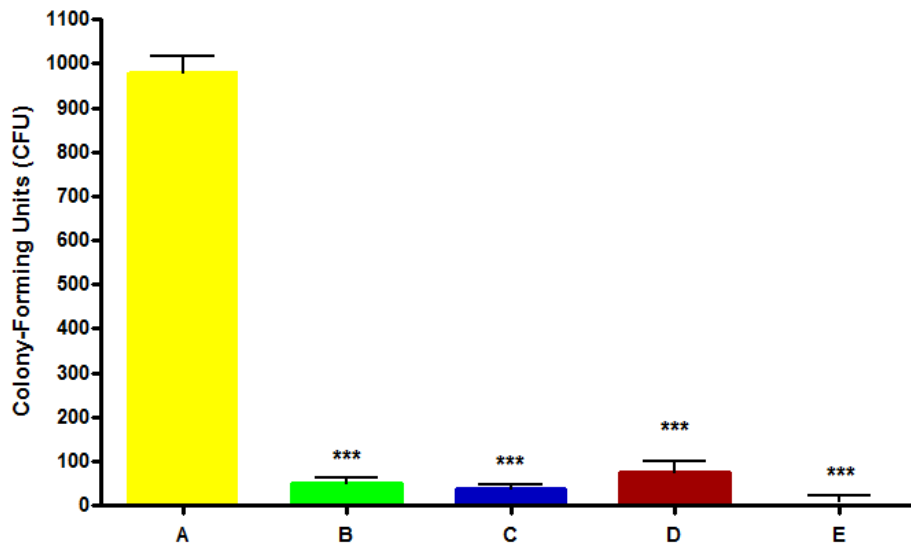


Fig. 1 *In vitro* evaluation of the inhibition of adherence to dental implants: (a) – Growth control; (b) – *C. nardus*; (c) – Citronellal; (d) – Nystatin; (e) – Chlorhexidine. (***) $p < 0.001$

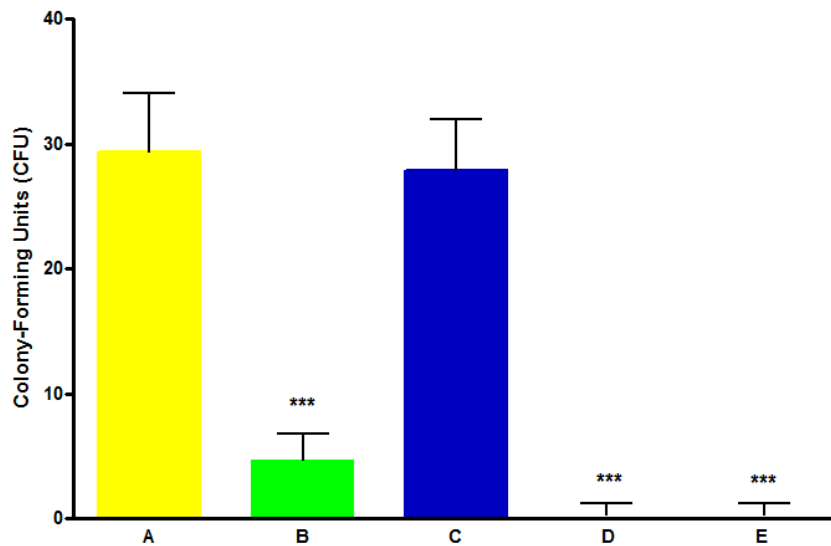


Fig. 2 *In vitro* evaluation of the inhibition of adherence to cover screws: (a) – Growth control; (b) – *C. nardus*; (c) – Citronellal; (d) – Nystatin; (e) – Chlorhexidine. (***) $p < 0.001$

Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis

The SEM analysis was performed in order to obtain images of the surfaces of the dental implants and cover screws after treatment with the experimental substances at MIC. Micrographs of the surfaces of the implants (Fig. 3a) and cover screws (Fig. 4a) were firstly taken to allow the visualization of the surfaces with no microorganisms. Then, micrographs of the dental implants and cover screws were taken after the incubation period, according to the following groups: (A) – Growth control (Fig. 3b and 4b); (B) – *Cymbopogon nardus*; (C) – citronellal; (D) – Nystatin; (E) – Chlorhexidine (Fig. 5 and 6 - a, b, c and d).

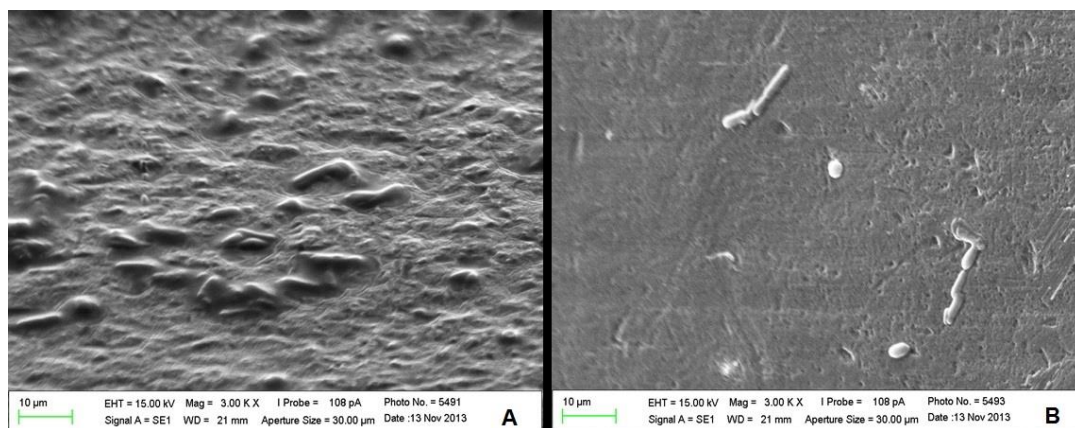


Fig. 3 (a) Surface of the dental implant - SLA Zircon®; (b) Growth control – *C. albicans* adhered to the surface of the implant (above the thread) (3000x).

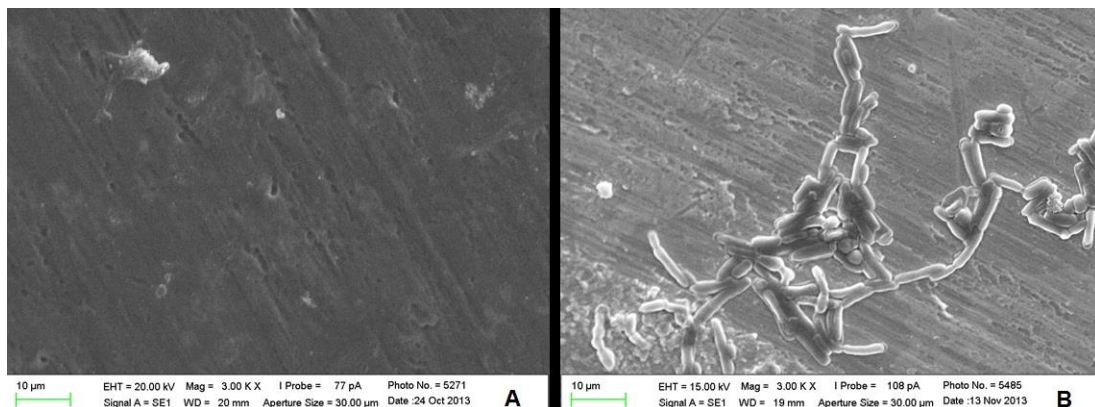


Fig. 4 (a) Surface of the cover screw; (b) Growth control – *C. albicans* adhered to the surface (3000x).

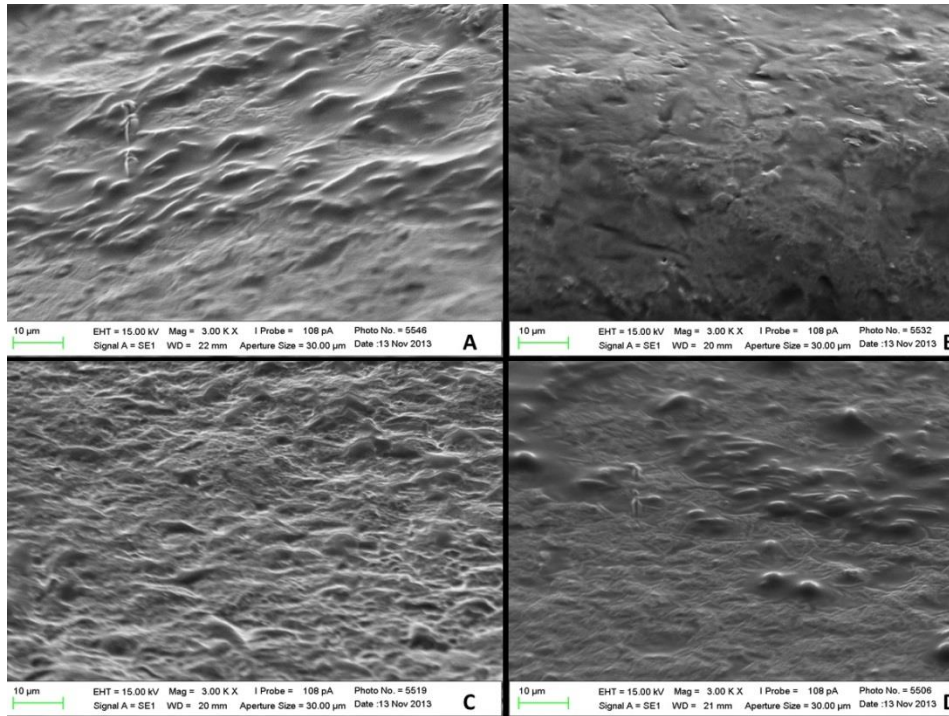


Fig. 5 Surfaces of the dental implants treated with the following substances at MIC: (a) *Cymbopogon nardus*; (b) Citronellal; (c) Nystatin; (d) Chlorhexidine. Note the lack of adherence of the yeasts to the surface of the implants (3000x).

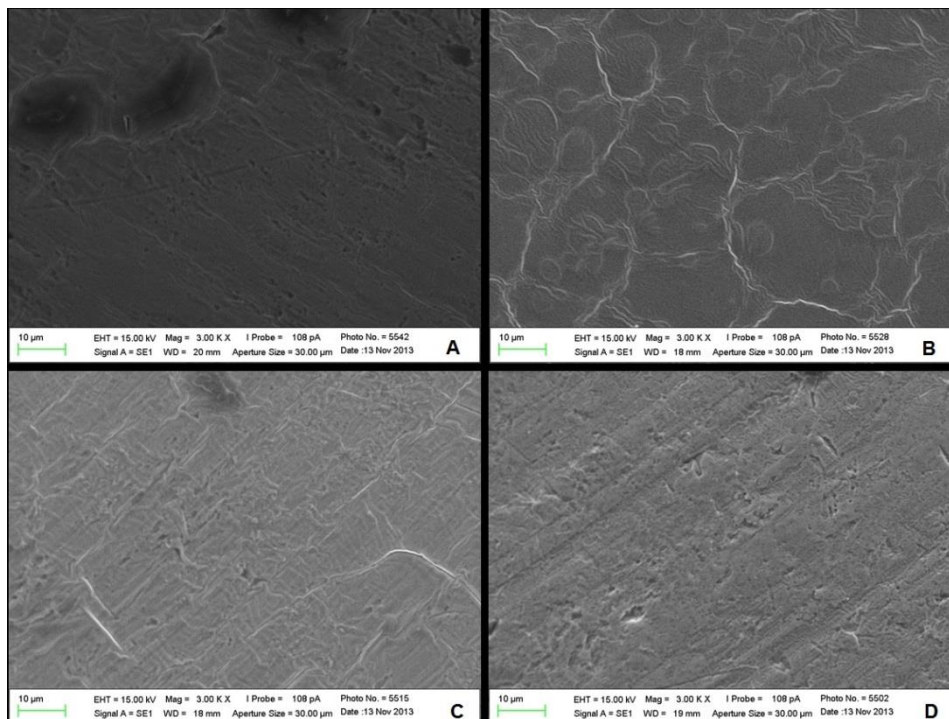


Fig. 6 Surfaces of the cover screws treated with the following substances at MIC: (a) *Cymbopogon nardus*; (b) Citronellal; (c) Nystatin; (d) Chlorhexidine. Note the lack of adherence of the yeasts to the surface of the cover screws (3000x).

DISCUSSION

The analysis of *C. nardus* essential oil by GC-MS identified the terpenoid citronellal as the major compound (37.75 %). This finding is in agreement with other studies in the literature [31-34], in which citronellal was quantified ranging from 29.6 % to 35.9 %. A number of factors may influence the chemical composition of the essential oil. The most important ones include: the plant part used for obtaining the oil, its origin, development stage and climatic conditions [35].

The results of this study showed that *C. nardus* essential oil had lower values of MIC and MFC in 83.3 % of the tested strains when compared to citronellal. This fact may be due to the existing synergism between the compounds of the essential oil, which makes it to display a better biological activity [36].

Even though some studies have shown that *C. nardus* essential oil as well as its major constituent citronellal have antifungal properties [37,38], their biological activity against *Candida* species remains poorly studied. The present study demonstrated that the essential oil and the phytoconstituent citronellal were able to inhibit 100 % of the strains at the concentrations of 64 µg/ml and 512 µg/ml, respectively. Investigating the antifungal activity of *C. nardus* essential oil on *C. albicans*, another study [39] found MIC of 450 µg/ml. These differences in the MIC values can be attributed to the chemical composition of the essential oil and to the different strains of microorganisms, although belonging to the same species.

The essential oil also had lower MIC and MFC values in relation to chlorhexidine against most of the strains studied. Chlorhexidine has proven antimicrobial action upon biofilm formation. However, adverse effects such as unpleasant taste, taste changes, pigmentation of teeth and oral desquamation are limiting factors for its prolonged use [20,21].

Although nystatin had the lowest MIC and MFC values against most of the strains tested, some authors [40,41] showed that *Candida* species may exhibit resistance to this standard antifungal. This resistance can be caused by the indiscriminate use of antimicrobials, which makes it interesting to search for new substances, mainly of natural origin. Therefore, further *in vitro* and *in vivo* studies of *C. nardus* essential oil and citronellal should be carried out.

In general, essential oils act by breaking or disrupting membranes due to their lipophilic compounds, which leads to loss of several enzymes and nutrients through the cell membrane [42,43]. In the test of inhibition of adherence to the dental implants, *C. nardus* essential oil and the phytoconstituent citronellal were able to inhibit fungal growth and showed statistically significant results compared to the growth control ($p < 0.001$), with no statistical difference when compared to nystatin and chlorhexidine ($p > 0.05$) though. As to the inhibition of adherence to the cover screws, *C. nardus* essential oil, nystatin and chlorhexidine inhibited the growth of *C. albicans* with statistically significant results compared to the growth control ($p < 0.001$). However, no significant difference was found when these groups were compared between each other ($p > 0.05$). Citronellal was not effective in inhibiting fungal adherence, displaying results similar to those of the growth control. *C. nardus* essential oil showed better results compared to citronellal likely due to the synergism between the compounds present in the oil, leading to a better biological activity.

In the qualitative analysis by SEM, *C. nardus* essential oil and citronellal were able to inhibit the adherence of the tested strains to the surface of the dental implants and cover screws. This study demonstrated by SEM analysis that *C. albicans* was able to adhere to the surfaces of dental implants and cover screws, corroborating other reports [11,44-46] on the ability of this species in adhering to surfaces and forming biofilms thereon. The dental implants used in this study had undergone surface treatment, which favors cell adherence and accelerates the process of osseointegration in the rehabilitation of edentulous patients. On the other hand, bacterial and fungal colonization is facilitated in treated-surface implants [47]. In addition, morphological alterations of the titanium surface influence the antifungal resistance of *Candida* biofilms [11].

CONCLUSION

The essential oil from *C. nardus* showed antifungal activity and was able to inhibit the adherence of *C. albicans* to the surfaces of the materials assayed, similarly to nystatin and chlorhexidine (standard drugs). Nevertheless, further *in vitro* and *in vivo* research should be undertaken to investigate the possible mechanisms of action and toxicological effects, with the purpose of developing an

effective natural product-containing formulation able to inhibit fungal adherence and infections.

REFERENCES

1. Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S (2006) Nine-to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 33:290–295.
2. Schwartz-Arad D, Samet N, Samet N, Mamlider A (2002) Smoking and complications of endosseous dental implants. *J Periodontol* 73(2):153-157.
3. Van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M (2002) The relative impact of local and endogenous patient-related. *Clin Oral Implants Res* 13(6):617-622.
4. Heitz-Mayfield LJA (2008) Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 35(Suppl. 8):293-304.
5. Lindhe J, Meyle J (2008) Peri-implant diseases: Consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* 35(Suppl. 8):282-285.
6. Klinge B, Hultin M, Berglundh T (2005) Peri-implantitis. *Dent Clin North Am* 49:661-676.
7. Humphrey S (2006) Implant Maintenance. *Dent Clin North Am* 50(3):463- 478.
8. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF (2000) Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res* 11(Suppl. 1):146-155.
9. Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ (2009) A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect* 72(2):104-110.
10. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL (2006) Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6:979–986.
11. Tsang CSP, Ng H, Mc Millan AS (2007) Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Invest* 11:361–368.
12. Leonhardt A, Bergstrom C, Lekholm U (2003) Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 5:226–232.

13. Monge RA, Roma'n E, Nombela C, Pla J. (2006) The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* 152(1):905-912.
14. Blankenship JR, Mitchell AP (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9:588–594
15. Triplett RG, Andrews JA, Hallmon WW (2003) Management of peri-implantitis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 15(1):129- 138.
16. Menendez A, Li F, Michalek SM, Kirk K, Makhija SK, Childers NK (2005) Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 20:31-34.
17. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Claffey N (2008) Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol* 35:305-315.
18. Heitz-Mayfield LJ, Salvi GE, Mombelli A, Faddy M, Lang NP (2012) Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* 23:205-10.
19. Wiltfang J, Zernial O, Behrens E, Schlegel A, Warnke PH, Becker ST (2012) Regenerative treatment of peri-implantitis bone defects with a combination of autologous bone and a demineralized xenogenic bone graft: a series of 36 defects. *Clin Implant Dent Relat Res* 14:421-7.
20. Paraskevas S (2005) Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg* 3(4):162-178.
21. Gunsolley JC (2006) A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc* 137:1649-57.
22. Bansod S, Rai M (2008) Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. *World J Med Sci* 3(2):81-88.
23. Calixto JB (2005) Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J Ethnopharmacol* 100:131-134.
24. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 46:446-475.

25. Cleeland R, Squires E (1991) Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections In: Lorian V Antibiotics in laboratory medicine. 3rd edn. Baltimore: Williams and Wilkiam, pp 739-787.
26. Hadacek F, Greger H (2000) Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Analysis* 11:137-147.
27. Bauer AWMM, Kirby JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(3):493-496.
28. Deswal DP, Chand U (1997) Standartization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellate* T.) seeds. *Seed Sci Technol* 25:409-417.
29. Ernst ME, Klepser ME, Wolfe EJ, Pfaller MA (1996) Antifungal Dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* spp. *Diagn Micr Infec Dis* 26:125-131.
30. Carreto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC (2007) Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. *Rev Odontol UNESP* 36(3):281-186.
31. Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, Accrombessi G, Frédéricich M, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J (2014) Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol* 151:652-659.
32. Wei LS, Wee W (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran J Microbiol* 5(2):147-152.
33. Roszaini K, Nor Azah MA, Mailina J, Zaini S, Faridz ZM (2013) Toxicity and antitermite activity of the essential oils from *Cinnamomum camphora*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca cajuputi* and *Dipterocarpus* sp. against *Coptotermes curvignathus*. *Wood Sci Technol* 47:1273-1284.
34. Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L (2009) *In vitro* cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 4:29-34.
35. Ozcan M, Erkmén O (2001) Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur Food Res Technol* 212(6):658-660.

36. Williamson EM (2001) Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8(5):401-409
37. Li WR, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB, Duan SS (2013) Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(16):7483-7492.
38. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM (2011) Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 18:1181-1190.
39. Corrêa NB, Gonçalves GMS (2010) Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas aromáticas frente a diferentes espécies de *Candida*. Anais do XV encontro de iniciação científica da PUC-Campinas.
40. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA (2001) Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res* 80:903–908.
41. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA (2002) Antifungal susceptibility of *Candida biofilms*: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1773–1780.
42. Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12:564-582.
43. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllic SG (2000) The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 88:170-175.
44. Harder S, Podschun R, Grancicova L, Mehl C, Kern M (2013) Analysis of the intrainplant microflora of two-piece dental implants. *Clin Oral Invest* 17:1135-1142.
45. Burgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M (2010) Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater* 6:2307-2313.
46. Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio E (2003) Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with diferente dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18(3):383-390.

47. Quirynen M, Van Der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, NAERT I, Busscher HJ, Van Steenberghe D (1993) An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res* 72(9):1304–1309.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o surgimento de micro-organismos resistentes à terapia convencional, torna-se importante o estudo de novos agentes antimicrobianos com a finalidade de se obter um produto fitoterápico como alternativa de tratamento [45]. Diante disso, os óleos essenciais e fitoconstituintes estão em constante investigação e tem demonstrado potencial atividade antimicrobiana [37,46]. No presente estudo, realizou-se uma triagem de óleos essenciais e fitoconstituintes por meio da técnica de disco-difusão em Agar Sabouraud Dextrose. A escolha desse método foi devido a sua simplicidade de execução e baixo custo, além de ser aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido como padrão pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Todos os produtos naturais analisados apresentaram expressiva atividade antifúngica frente às cepas de *Candida*, porém foram escolhidos o óleo essencial de *C. nardus* e o fitoconstituente citronelal por existirem poucos relatos na literatura sobre seus efeitos em cepas de *Candida*, especialmente em relação à inibição da aderência desses micro-organismos em superfícies de materiais, visto que, as espécies de *Candida* têm importância na formação de biofilmes, condição em que se tornam mais resistentes à terapia antimicrobiana convencional. Além disso, o citronelal apresentou resultados superiores na triagem em relação ao óleo essencial de *C. nardus*, o que poderia sugerir que esse fitoconstituente apresentaria melhores resultados de CIM, CFM e de inibição de aderência à superfície dos materiais quando comparado ao óleo essencial, o que não foi demonstrado pelos resultados do estudo em questão, supondo que o sinergismo entre os compostos presentes no óleo teria importância na sua atividade biológica.

A atividade biológica está intimamente relacionada aos metabólitos secundários produzidos pelas plantas e conhecer os constituintes químicos que compõe o óleo essencial permite apontar seus principais componentes, afim de melhor investigar os efeitos farmacológicos e seu papel no mecanismo de ação. Diante disso, foi realizada a análise em GC-MS do óleo essencial de *C. nardus* permitindo identificar o citronelal como componente majoritário.

Para melhor avaliação dos resultados da triagem, foram realizadas a CIM e CFM do óleo essencial de *C. nardus* e citronelal. O teste de microdiluição foi o

método utilizado para determinar a CIM devido à sua maior sensibilidade, aumentando a confiabilidade dos resultados [47]. A CFM foi realizada para determinar em que concentração os produtos eram capazes de eliminar a cepa (fungicida), diferentemente da CIM, que apenas inibe seu crescimento (fungistático).

A virulência da *C. albicans* está relacionada à plasticidade morfológica e capacidade de formação de biofilmes [21]. A fase inicial e essencial na patogênese da candidíase oral implica na fixação da *C. albicans* a uma superfície de acolhimento ou um dispositivo implantado, tal como as próteses e implantes dentários [22,23]. Diante disso, realizou-se o teste de inibição da aderência às superfícies dos implantes dentários e *cover screws* com posterior análise em MEV. Os resultados demonstraram que a *C. albicans* foi capaz de se aderir às superfícies dos materiais e os produtos naturais foram capazes de inibir a sua aderência.

A nistatina apresenta atividade antifúngica comprovada e é utilizada em infecções fúngicas superficiais. Já a clorexidina possui ação comprovada no combate à formação de biofilmes e apresenta um amplo espectro antimicrobiano tanto sobre bactérias quanto sobre fungos [29] e possui indicação como método químico adjuvante no tratamento da peri-implantite [30-32]. Dessa forma, foram utilizados como controles positivos nos ensaios microbiológicos.

Estudos futuros devem ser realizados a fim de investigar os possíveis mecanismos de ação e efeitos toxicológicos do óleo essencial de *C. nardus* e fitoconstituente citronelal, buscando a possibilidade de formulações de um produto natural eficaz na inibição da aderência em superfícies de materiais e de infecções causadas por fungos envolvidos com infecções bucais.

5. CONCLUSÃO

Diante da análise dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- Os óleos essenciais de *C. camphora* (canfora branca), *M. officinalis* (erva cidreira), *O. basilicum* (manjeriço) e *C. nardus* (citronela), bem como os fitoconstituintes alfa pineno, citral, citronelal e carvacrol apresentaram atividade antifúngica frente às cepas de *Candida*.
- A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa do óleo essencial de *C. nardus* demonstrou que o terpenoide citronelal foi o componente majoritário
- O óleo essencial de *C. nardus* e o fitoconstituente citronelal apresentaram CIM₁₀₀ de 64 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente.
- A CFM capaz de eliminar 100% das cepas foi de 128 µg/mL e 1024 µg/mL para o óleo essencial de *C. nardus* e citronelal, respectivamente.
- O óleo essencial inibiu a aderência de *C. albicans* nos implantes dentários e *cover screws*, ações semelhantes à nistatina e clorexidina, substâncias de referência utilizadas nesse estudo.
- O citronelal inibiu apenas o crescimento da cepa nos implantes dentários, não apresentando resultados significantes nos *cover screws* em relação ao controle de crescimento.
- O MEV demonstrou que a *C. albicans* se aderiu à superfície dos implantes dentários e *cover screws*.

REFERÊNCIAS*

1. Aglietta M, Siciliano VI, Zwahlen M, Brägger U, Pjetursson BE, Lang NP, Salvi GE. A systematic review of the survival and complication rates of implant supported fixed dental prostheses with cantilever extensions after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 441-451.
2. Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implantsupported single crowns. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 119-130.
3. Lang NP, Pjetursson BE, Tan K, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. II. Combined tooth–implant-supported FPDs. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 643-653.
4. Kreissl ME, Gerds T, Muche R, Heydecke G, Strub JR. Technical complications of implant-supported fixed partial dentures in partially edentulous cases after an average observation period of 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 720-726.
5. Papaspyridakos P, Chen CJ, Chuang SK, Weber HP, Gallucci GO. A systematic review of biologic and technical complications with fixed implant rehabilitations for edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012; 27: 102-110.
6. Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 625-642.
7. Schwartz-Arad D, Samet N, Samet N, Mamlider A. Smoking and complications of endosseous dental implants. *Journal of Periodontology*. 2002; 73: 153-157.
8. Van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M. The relative impact of local and endogenous patient-related. *Clinical Oral Implants Research*. 2002; 13(6): 617-622.
9. Heitz-mayfield LJA. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008; 35 Suppl 8: 293-304.
10. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008; 35 Suppl 8: 282-285.

11. Klinge B, Hultin M, Berglundh T. Peri-implantitis. *Dental Clinics of North America*. 2005; 49: 661-676.
12. Humphrey S. Implant Maintenance. *Dental Clinics of North America*. 2006; 50(3): 463- 478.
13. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clinical Oral Implants Research*. 2000; 11: 146-155.
14. Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection*. 2009; 72(2): 104-110.
15. Appleton SS. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics and treatment. *J Calif Dent Assoc*. 2000; 28(12): 942-8.
16. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EHN, Beena VT, Yeung KWS. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9): 3296-302.
17. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. *In vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont*. 2005; 18(5): 392-8.
18. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9(6): 588-94.
19. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol* 2006; 51(1): 672-680.
20. Crocco E, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidiases superficiais. *An Bras Dermatol*. 2004; 79: 689-97.
21. Monge RA, Roma'n E, Nombela C, Pla J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* 2006; 152(1): 905-912.
22. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6: 979–86.
23. Tsang CSP, NG H, Mc MILLAN AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Invest*. 2007; 11: 361–8.

24. Leonhardt A, Bergstrom C, Lekholm, U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003; 5: 226–32.
25. Triplett RG, Andrews JA, Hallmon WW. Management of peri-implantitis. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America.* 2003; 15(1): 129-138.
26. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis, MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiology and Immunology.* 2005; 20(6): 349-53.
27. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Akiti T, Barreiros MGC, Uzeda M, Nucci M. prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. *Brazilian Oral Research.* 2007; 21(2): 182-7.
28. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2007; 40(3): 272-6.
29. Menendez A, Li F, Michalek SM, Kirk K, Makhija SK, Childers NK. Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(1): 31-34.
30. Renvert S, Roos-jansaker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 305-15.
31. Heitz-Mayfield IJ, Salvi GE, Mombelli A, Faddy M, Lang NP. Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23: 205-10.
32. Wiltfang J, Zernial O, Behrens E, Schlegel A, Warnke PH, Becker ST. Regenerative treatment of peri-implantitis bone defects with a combination of autologous bone and a demineralized xenogenic bone graft: a series of 36 defects. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012; 14: 421-7.
33. Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *International Journal of Dental Hygiene.* 2005; 3(4): 162-78.
34. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *The Journal of the American Dental Association.* 2006; 137: 1649-57.

35. Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. World Journal of Medical Sciences. 2008; 3(2): 81-88.
36. Calixto J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. Journal of Ethnofarmacology. 2005; 100: 131-134.
37. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 446-475.
38. Castro HG, Barbosa ICA, Leal TCAB, Souza CM, Nazareno, AC. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2007; 9(4): 55-61.
39. Beneti SC, Rosset E, Corazza ML, Frizzo CD, Luccio MD, Oliveira JV. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. J Food Eng. 2011; 102: 348–354.
40. Man HC, Hamzah MH, Jamaludin H, Abidin ZZ. Preliminary study: kinetics of oil extraction from citronella grass by ohmic heated hydro distillation. APCBEE Procedia. 2012; 3: 124-128.
41. Billerbeck VG, Roques CG, Bessière J-M, Fonvieille J-L, Dargent R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. Can J Microbiol 2001; 47: 9-17.
42. Li WR, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB, Duan SS. Antifungal effects of citronela oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(16): 7483-92.
43. 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: 1181-1190.
44. Delespaul Q, Billerbeck VG, Roques CG, Michel G. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. J Essent Oil Res. 2000; 12: 256-266.
45. Penna C, Marino S, Vivot E, Cruaños MC, Muñoz JD, Cruaños J, Ferraro G, Gutkind G, Martino V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. J Ethnopharmacol. 2001; 77: 37-40.

46. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94: 223-253.

47. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2008; 18(2): 301-307.

* 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.