



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

**IOLANDA MARIA CARIRY LACET DE BARROS MARTINS**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *CITRUS LIMON***  
**Linn. FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

**JOÃO PESSOA-PB**

**2009**

**IOLANDA MARIA CARIRY LACET DE BARROS MARTINS**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *CITRUS LIMON*  
Linn. FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para qualificação no Mestrado em Diagnóstico Bucal.

Linha de Pesquisa: Fitoterapia Aplicada à Odontologia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Giuseppe Anacleto Scarano Pereira

JOÃO PESSOA-PB

2009

**IOLANDA MARIA CARIRY LACET DE BARROS MARTINS**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *CITRUS LIMON*  
Linn. FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para qualificação no Mestrado em Diagnóstico Bucal.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima  
Orientadora (UEPB)

---

Prof. Dr. Lino João da Costa  
(UEPB)

---

Prof. Thúlio Antunes de Arruda  
(UEPB)

*"A excelência pode ser obtida se você se importa mais do que os outros julgam ser necessário; se arrisca mais do que os outros julgam ser seguro, sonha mais do que os outros julgam ser prático, e espera mais do que os outros julgam ser possível."*

Vince Lombardi

Ao meu amado marido e aos meus  
lindos filhos.  
À minha família. DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu imenso Deus, que mais uma vez me mostrou a grandiosidade do seu plano para a minha vida, e o quanto vale a pena abandonar-se Nele. E à minha Mãe Santíssima, por sua intercessão e proteção em todos os momentos de minha caminhada.

Ao meu marido e melhor amigo, Danilo, que com seu apoio incondicional e presença amorosa constante ensinou-me que crescer é ter a humildade de aprender com o passado, não se conformar com o presente e desafiar o futuro, sempre.

Aos meus desejados e amados filhos, Danton e Henrique, motivos de nosso orgulho e da minha busca constante de superação.

Aos meus pais, Mac Arthur e Socorro, cuja fé em mim me ensinou a ter fé em mim mesmo e em Deus.

Aos meus irmãos, Luiz e Gizeuda, companheiros de brincadeiras ontem, companheiros de vida hoje. E aos meus cunhados, Janine e Bruno, além do meu reizinho Davi. À minha avó Iolanda, pelo acolhimento e apoio.

Aos meus sogros, Irany e Genival Martins; aos meus cunhados Danúsio e Andrea, Michele e Jefferson, Daniele e Jonathan; aos sobrinhos de coração, Guilherme, Laís e Camila, pelo apoio que apenas uma família de verdade pode dar.

À minha incansável orientadora, Edeltrudes, cuja energia e dedicação ao trabalho me mostraram que problemas não são obstáculos, mas oportunidades ímpares de superação e evolução.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Wylly Lima e Giliara Luna, pela paciência e estimada colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos Sérgio e Aluízia Carvalho, Keila Barroso, João Frank Dantas, Fabiano Pachêco, Ana Carolina Albuquerque, Gustavo Agripino, Betânia Fachetti, Maria Oliveira, Rosalya Coura e todos os outros, pelo apoio, incentivo, desprendimento e companheirismo verdadeiros demonstrados nestes meses de intensa e maravilhosa convivência.

Aos coordenadores deste Programa de Pós-graduação, em especial aos amigos Fabiano Gonzaga e Lino João, por nos ensinarem que a verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.

A todos os nossos professores, empenhados em transmitir conhecimentos e enriquecer a ciência como um todo.

Aos professores Laurylene César e Thúlio Antunes, pelas críticas sinceras e construtivas, colaborando para o engrandecimento do meu trabalho.

Aos funcionários da Secretaria, pela prontidão e bom atendimento.

## RESUMO

Durante muito tempo, os remédios empregados no tratamento e prevenção de doenças e lesões eram originários das plantas, constituindo-se, não raro, no único recurso de que dispunham os médicos para tratar seus doentes. Na Odontologia, a utilização destes medicamentos chamados de fitoterápicos ainda é pequena e dá-se principalmente no mercado informal. Uma regulamentação nesse sentido mostra-se de extrema importância, e pesquisas têm sido feitas com o objetivo de validar cientificamente o uso de alguns destes produtos naturais como agentes antimicrobianos, o que abriria espaço para sua aplicação clínica em diversas afecções que acometem a cavidade bucal, em especial aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida*. Nesse contexto, o presente estudo visou avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Citrus limon* Linn. sobre 22 cepas de *Candida* spp., através da determinação da CIM e da CFM, da avaliação do tempo de morte microbiana e das alterações morfológicas das cepas ensaiadas decorrentes da ação do produto natural testado. A CIM foi obtida através da técnica da microdiluição, e a CFM a partir do subcultivo da concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas. A avaliação da interferência da CIM do produto testado sobre o tempo de morte microbiana foi realizada através da contagem de células viáveis e o estudo das alterações morfológicas devido à ação do produto natural deu-se a partir da técnica do microcultivo, com posterior observação em microscópio óptico. O valor da CIM do óleo essencial de *C. limon* ficou estabelecida entre 0,078 e 0,156 µg/mL, e a CFM variou de 0,078 a 1,250 µg/mL. Quanto à cinética de morte microbiana, observou-se efeito fungicida nas concentrações de CIMx8 e CIMx4, com ação inicial após 2-4 horas de exposição das leveduras. A observação microscópica da morfogênese das leveduras sob ação do produto testado mostrou inibição na formação de clamidoconídios e pseudo-hifas na maior parte das cepas ensaiadas, resultado comparável ao do antimicrobiano sintético utilizado como controle, o miconazol. Concluiu-se, assim, que o O.E. de *C. limon* possui destacada ação fungicida, podendo ser eficaz na inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida*.

**Palavras-Chave:** *Citrus limon*, Óleo essencial, *Candida* e Fitoterapia

## ABSTRACT

For a long time, the drugs used in the treatment and prevention of diseases and injuries were from plants becoming, often, the only resource that doctors had to treat their patients. In dentistry, the use of herbal medicines is still small and takes place mainly in the informal market. It is extremely important there be legislation to that end, in addition, research has been done in order to scientifically validate the use of some of these natural products as antimicrobial agents, which would open up space for clinical application in different diseases affecting the oral cavity especially those caused by *Candida* spp. In this context, this study aimed to evaluate the antifungal activity of essential oil of *Citrus limon* Linn. about 22 strains of *Candida* spp. by determining the CIM and CFM of the time evaluation of microbial death and morphological changes of the strains tested under the action of natural product tested. The CIM was obtained by the microdilution technique and CFM was obtained from the subculture of the concentration corresponding to the inhibitory and the two concentrations more concentrated. The evaluation of the interference of CIM product tested over time of microbial death was performed by counting viable cells. The study of morphological changes due to the action of the natural product was made from the microculture technique, with further observation under optical microscope. It was established the value of CIM of essential oil of *C. limon* between 0.078 and 0.156 mg/mL and CFM had a variation between 0.078 to 1.250 mg/mL. The kinetics of microbial death, there was fungicidal effect at concentrations of CIMx8 and CIMx4, with initial action after 2-4 hours of exposure of yeast. Microscopic observation of morphogenesis of the yeast under the action of the product tested showed inhibition in the formation of chlamydospores and pseudo-hyphae in most strains tested, this result was comparable to that of synthetic antimicrobial used as a control, the miconazole. We conclude therefore that the essential oil of *C. limon* has a important fungicide action and can be effective in the inhibition of *Candida* spp.

**Keywords:** *Citrus limon*, Essential Oil, *Candida* and Phytotherapy

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ASD - Agar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO - dimetilsufóxido

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HIV - Human Immunodeficiency Virus

INTERLAB - Laboratório de Tecnologias Interativas

IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária

LTF - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

O.E. - Óleo Essencial

OMS - Organização Mundial de Saúde

TTC - Trifeniltetrazolium

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1 – Usos medicinais de <i>Citrus limon</i> segundo tradição popular..... | 24 |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 – Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM / n = 22) do óleo essencial de <i>C. limon</i> sobre espécies de <i>Candida</i> pela técnica de microdiluição. .... | 41 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 2 – Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM /n = 22) do óleo essencial de <i>C. limon</i> sobre espécies de <i>Candida</i> em placa de microdiluição. .... | 43 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - <i>Citrus limon</i> Linn .....                                                                                                                                                                                                                 | 32 |
| FIGURA 2 - Leitura do ensaio da determinação da CIM do óleo essencial de <i>C. limon</i> , pela técnica da microdiluição .....                                                                                                                            | 42 |
| FIGURA 3 - Ensaio Cinética microbiana – cepa <i>C. albicans</i> ICB 12, sob a ação do O. E. de <i>C. limon</i> na concentração de CIM/2 : t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas ..... | 46 |
| FIGURA 4 - Ensaio Cinética microbiana – cepa <i>C. albicans</i> ICB 12, sob a ação do O. E. de <i>C. limon</i> na concentração de CIM: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas .....    | 47 |
| FIGURA 5 - Ensaio Cinética microbiana – cepa <i>C. albicans</i> ICB 12, sob a ação do O. E. de <i>C. limon</i> na concentração de CIMx2: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas .....  | 48 |
| FIGURA 6 - Ensaio Cinética microbiana – cepa <i>C. albicans</i> ICB 12, sob a ação do O. E. de <i>C. limon</i> na concentração de CIMx4: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas .....  | 49 |
| FIGURA 7 - Ensaio Cinética microbiana – cepa <i>C. albicans</i> ICB 12, sob a ação do O. E. de <i>C. limon</i> na concentração de CIMx8 : t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas ..... | 50 |

FIGURA 8 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do miconazol: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas..... 51

FIGURA 9 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, no experimento controle livre de produtos-teste: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas..... 52

FIGURA 10 - Aspecto microscópico da cepa *C. albicans* ICB 12: (a, b) sob ação do O. E. de *C.limon*; (c) sob a ação do miconazol; (d) experimento controle..... 56

GRÁFICO 1 - Curva de morte microbiana (Log UFC/min) da cepa *C. tropicallis* ATCC 13803, sob ação do O. E. de *C. limon* e do miconazol..... 44

GRÁFICO 2 - Curva de morte microbiana (Log UFC/min) da cepa *C. albicans* ICB 12, sob ação do O. E. de *C. limon* e do miconazol ..... 45

## SUMÁRIO

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                   | 13 |
| <b>1.1 Objetivos</b>                                                                  | 15 |
| 1.1.1 Geral                                                                           | 15 |
| 1.1.2 Específicos                                                                     | 15 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                        |    |
| 2.1 Fitoterapia                                                                       | 16 |
| 2.2 Óleos Essenciais                                                                  | 20 |
| 2.3 <i>Citrus limon</i>                                                               | 22 |
| 2.4 Fungos                                                                            | 26 |
| 2.5 Antifúngicos                                                                      | 29 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                           |    |
| 3.1 Local do Estudo                                                                   | 32 |
| 3.2 Período                                                                           | 32 |
| 3.3 Produtos Testados                                                                 | 32 |
| 3.4 Produto Sintético                                                                 | 33 |
| 3.5 Cepas Utilizadas                                                                  | 33 |
| 3.6 Suspensão dos Microrganismos – Inóculo                                            | 34 |
| 3.7 Meios de Cultura                                                                  | 35 |
| 3.8 Metodologia                                                                       | 35 |
| 3.8.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Técnica da Microdiluição | 35 |
| 3.8.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)                             | 37 |
| 3.8.3 Estudo da Cinética de Morte Microbiana                                          | 37 |
| 3.8.4 Avaliação da interferência do produto sobre a morfologia das leveduras          | 38 |
| 3.9 Tratamento estatístico                                                            | 39 |
| <b>4 RESULTADOS</b>                                                                   | 40 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>                                                                    | 57 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>                                                                    | 64 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                    | 65 |

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na arte de curar é uma forma de tratamento de origem muito antiga, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações. Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diferentes doenças (SOUZA *et al.*, 2007). Desde a Declaração de Alma-Ata, em 1978, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta que 80% da população mundial utiliza essas plantas ou suas preparações no que se refere à atenção primária de saúde. Ao lado disso, destaca-se a participação dos países em desenvolvimento nesse processo, já que possuem 67% das espécies vegetais do mundo (BRASIL, 2006).

A OMS vem estimulando o uso da Medicina Tradicional / Complementar, e no Brasil isto também tem ocorrido como alternativa às técnicas da medicina tradicional, de forma integrada, nos sistemas de saúde. Esta medida visa proporcionar desenvolvimento de políticas observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso. Considerando que a Fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, tal abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2006).

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de fitomedicamentos, já que apresenta a maior diversidade vegetal do mundo, além de ampla sociodiversidade, uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente esse aprendizado. Na Odontologia, a utilização destes medicamentos ainda é pequena. No entanto, estudos com o objetivo de avaliar atividade antimicrobiana de produtos vegetais vêm alcançando vulto científico e abrindo espaço para a aplicação clínica dos mesmos, favorecendo especialmente a Odontologia integrada à Medicina Comunitária (GRÉGIO, 2006).

A cavidade bucal é uma área que pode ser amplamente beneficiada pelas pesquisas com fitoterápicos. Por ser reconhecidamente uma área de microbiota diversificada, é sede freqüente de infecções virais, bacterianas e fúngicas. As leveduras mais comuns na cavidade bucal pertencem ao gênero *Candida*, em especial *C. albicans*, e a infecção causada por estas é denominada de candidíase ou candidose, tida como a infecção oportunista predominante na mucosa oral (BRIAN *et al.*, 1995; GREENBERG *et al.*, 2008; JORGE *et al.*, 1997; MOREIRA, A.C. *et al.*, 2001; SAMARANAYAKE; KEUNG LEUNG; LIJIAN JIN, 2009).

A patogenicidade destas está relacionada a uma combinação de fatores, como a produção de enzimas extracelulares, que contribuem para sua virulência (LACAZ *et al.*, 2002). A candidíase oral pode ser associada a disfagia e a uma sensação de queimação dolorosa, mas é assintomática na maioria das vezes. O surgimento de candidíase oral está relacionado com a diminuição da defesa orgânica, causada por diferentes terapias medicamentosas, doenças sistêmicas e condições debilitantes. Além disso, há a influência de mudanças locais, na cavidade oral. Tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunodeprimidos, a espécie fúngica predominante é *Candida albicans*, mas *C. glabrata* e *C. tropicalis* são também comuns (BRIAN *et al.*, 1995; GREENBERG *et al.*, 2008).

As candidíases, inclusive aquelas associadas à estomatite protética, não são de fácil tratamento, sendo comum a recidiva após a interrupção do mesmo. Isso representa um desafio na prática estomatológica, em face da freqüência da infecção e do pequeno número de drogas antifúngicas disponíveis em nosso meio (BATISTA *et al.*, 1999).

Tendo em vista as limitações dos antifúngicos sintéticos existentes atualmente, quer seja com relação a efeitos colaterais ou à disponibilidade dos mesmos, há mister de se desenvolver novas estratégias terapêuticas, aqui residindo a importância do uso de fitomedicamentos. Visando a obtenção de uma alternativa de tratamento, buscou-se realizar um estudo com metodologia “in vitro” do óleo essencial de *Citrus limon* para determinação da atividade antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida*, a partir de isolados da cavidade bucal e de cepas de referência (ATCC).

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Geral

Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Citrus limon* Linn. sobre leveduras potencialmente patogênicas do gênero *Candida*.

### 1.1.2 Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima – CIM - do óleo essencial de *C. limon*;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima – CFM - do óleo essencial de *C. limon*;
- Avaliar a interferência da CIM do óleo essencial de *C. limon* sobre o padrão/ cinética de crescimento das cepas fúngicas;
- Avaliar as alterações morfológicas decorrentes da ação do óleo essencial de *C. limon* sobre leveduras do gênero *Candida*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fitoterapia

A humanidade depende diretamente da biodiversidade para extrair ou produzir alimentos, cosméticos, novos materiais e processos. O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, animais e vegetais foram a principal fonte de fármacos (SOUZA *et al.*, 2007).

As plantas têm representado uma fonte valiosa de produtos para manutenção da saúde humana, havendo um aumento dessa tendência especialmente nos últimos anos, após numerosos estudos com produtos terapêuticos de plantas medicinais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são as melhores fontes para se obter uma variedade de drogas, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. A seleção de plantas a partir de informações da medicina tradicional ou popular pode conduzir à descoberta de moléculas promissoras (SANTOS *et al.*, 2007).

A Fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. Tal abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2006). Para reforçar esta idéia, a possibilidade de introduzir a fitoterapia no sistema público de saúde vem sendo considerada desde 1988, através da resolução n.8/88 da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN) e faz parte das diretrizes da I Conferência Nacional de Assistência Farmacêutica [CNMAF, 2003] (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

Segundo a ANVISA, fitoterápico é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos

etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3 (BRASIL, 2004).

O estudo de plantas medicinais a partir do emprego pelas comunidades nativas pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agronômicos sobre estas plantas, com grande economia de tempo e dinheiro. Desta forma, podemos planejar a pesquisa a partir do conhecimento empírico já existente, muitas vezes consagrado pelo uso popular, que deverá ser testado em bases científicas (TOMAZZONI *et al.*, 2006; BRASILEIRO *et al.*, 2008). Já foi enfatizada, inclusive, a necessidade de um maior rigor na avaliação da credibilidade da literatura apresentada para suporte à análise de fitoterápicos, assim como da solicitação de seu registro (OLIVEIRA *et al.*, 2007a).

Em uma fase anterior, o grande avanço apresentado pela indústria farmacêutica tradicional proporcionou à população mundial um acesso mais fácil às drogas, favorecendo globalmente a promoção da saúde. Apesar dos grandes benefícios trazidos por esse progresso, eles se fizeram acompanhar de alguns malefícios: embora tenham sido desenvolvidos novos antibióticos sintéticos e modificadas algumas drogas já existentes, nas últimas três décadas a resistência dos microrganismos frente a essas moléculas vem aumentando. Desse modo, as infecções poderão ocorrer, resultando em elevação da morbidade e mortalidade (SANTOS *et al.*, 2007). De acordo com Burt, 2004, isso vem estimulando uma nova procura pela utilização de fitoterápicos, suscitando uma busca gradativamente maior em torno desse tema. Já se criou o termo “Consumismo Verde” para definir esse interesse atualmente suscitado pelos produtos fitoterápicos.

Nos últimos anos, a atenção mundial vem-se voltando para a biodiversidade brasileira, havendo um enfoque especial na variedade de sua flora. Seu uso medicamentoso tem sido aperfeiçoado ao longo dos séculos, graças à junção de conhecimentos dos povos que formaram o mosaico cultural que caracteriza essa nação. No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta fundamental influência das culturas indígena, africana e européia. A cultura brasileira sofreu sérias influências desta mistura de etnias, tanto no aspecto espiritual, como material, fundindo-se aos conhecimentos existentes na ancestralidade do país. A base da formação da medicina popular é hoje retomada pela medicina natural, com os fitomedicamentos, que aproveita seu conhecimento prático dando-lhe,

porém, um caráter científico, na tentativa de restituir a saúde ao ser humano, de uma forma menos artificial. Um dos fatores que contribui para a larga utilização de plantas para fins medicinais no Brasil é o grande número de espécies vegetais encontradas no país. Nos últimos anos, tem aumentado a aceitação da fitoterapia, incrementando a produção industrial dos laboratórios (BORBA; MACEDO, 2006; TOMAZZONI *et al.*, 2006).

A riqueza da flora brasileira tem conferido a esse país uma posição de destaque nunca antes experimentada. Hoje, notamos o despertar de uma maior atenção à devastação empreendida contra o meio ambiente. Originalmente, a Mata Atlântica se estendia por 15% do território brasileiro. Atualmente, está restrita a menos de 5%. Entretanto, ela ainda corresponde a uma das maiores áreas de biodiversidade do planeta (FRANÇA *et al.*, 2008). Tendo em vista os múltiplos empregos possíveis para as espécies vegetais no país, essa mudança de consciência é bastante oportuna, visando uma exploração sistemática e racional das potencialidades oferecidas aos níveis industrial, comercial e científico. Esse esforço pode trazer um grande impulso para a inclusão do país no rol das nações pesquisadoras das plantas como fornecedoras de princípios ativos para a produção de medicamentos.

No campo de medicamentos fitoterápicos no país, repete-se a situação que ocorre na área de medicamentos sintéticos, onde grande parte da matéria-prima é importada, não sendo produzida no Brasil. Esse cenário do mercado nacional de fitoterápicos exclui do seu contexto o produtor rural, levando em conta que a proscrição das drogas vegetais nativas deixa de envolver esse ator social que poderia estar agregando valores à agricultura nacional, sobretudo a nível familiar, já que no Brasil as pequenas propriedades rurais representam os principais locais de produção de ervas medicinais (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Observa-se um interesse crescente em torno dos fitomedicamentos, e isso se justifica pelo fato de que estes apresentam diversas vantagens, quando comparados à terapêutica convencional, no que tange a menor incidência de efeitos colaterais, toxicidade relativa diminuída, baixo custo e no fato do Brasil apresentar uma enorme população de fitomedicamentos em sua flora nativa. Considera-se também que o uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de

resistência bacteriana a esses compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (SOUZA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2006). Todos esses fatores podem ter influenciado a redescoberta da medicina natural, e nesse ressurgimento, a fitoterapia deixa de lado seu empirismo inicial, ganhando o respaldo de um crescente número de pesquisas e estudos, traduzindo-se como uma síntese da relação direta entre a medicina popular e o conhecimento científico.

É importante lembrar que o uso de fitomedicamentos não está isento de riscos: a crença na “naturalidade inócua” dos fitoterápicos e plantas medicinais não é facilmente contradita, pois as evidências científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados com o uso destas plantas dificilmente chegam ao conhecimento dos usuários (SILVEIRA *et al.*, 2006). Há estudos que alertam para o risco de toxicidade de fitoterápicos e de seu uso indiscriminado pela população leiga (AGRA *et al.*, 2007). Além disso, ainda se observam lacunas no que concerne a indicação correta dos fitoterápicos para o tratamento de alguma doença (FRANÇA *et al.*, 2008).

Observando-se os dados encontrados na literatura, constatou-se uma grande carência de estudos *in vitro* e *in vivo*, enquanto que o maior contingente de pesquisas disponíveis é composto de análises pré-clínicas. (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005). Pesquisas realizadas nas universidades brasileiras já identificaram mais de 350 mil espécies vegetais, o que denota a existência de uma ampla variedade, que, teoricamente, pode ser destinada a uso medicinal. Entre tantas espécies, apenas algumas têm emprego terapêutico conhecido. No Brasil, há cerca de cem mil espécies catalogadas, sendo apenas duas mil com uso científico comprovado (REZENDE; COCCO, 2002).

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento dos fitoterápicos, aplicados à Odontologia. Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados para a avaliação de espécies vegetais nessa área de interesse, como *Equinacea purpurea*, *Copaifera multijuga*, *Lippia sidoides*, *Stryphnodendron adstringens*, dentre outras. A Fitoterapia proporciona alternativas de tratamento para afecções odontológicas. Algumas espécies têm sido amplamente empregadas na medicina popular e vêm sendo submetidas a alguns ensaios na área da Odontologia. Nesse campo, existe uma variedade importante de plantas que servem ao uso terapêutico: espécies como Cravo da Índia, Romã, Malva, Tanchagem, Amoreira, Sálvia, Camomila, dentre

outras, são indicadas nos casos de gengivite, abscesso na boca, inflamação e aftas. Embora o emprego dessas plantas seja difundido, ainda faltam estudos científicos que amparem tal uso e permitam estabelecer um perfil de espécies para uso em Odontologia. Assim, faz-se necessário o direcionamento de pesquisas para esta área, culminando com o desenvolvimento de fitoterápicos de qualidade e validados para uso odontológico, bem como permitindo a divulgação destes estudos para a população e profissionais afins (OLIVEIRA *et al.*, 2007b).

## 2.2 Óleos Essenciais

Na pesquisa de produtos naturais, atualmente se observa uma tendência à busca pela obtenção de fitoconstituintes a partir de extratos, frações, óleos fixos ou essenciais, obtidas de espécies vegetais para uma possível aplicação na prática terapêutica de processos infecciosos causados por fungos, bactérias, parasitas e vírus (ARRUDA, 2006). Dentre esses compostos, os óleos essenciais assumem uma posição de destaque, dadas suas propriedades singulares.

Óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, orgânicos, lipofílicos, voláteis, aromáticos, também sendo conhecidos, como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. São extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes (ARAÚJO, 2005).

Historicamente, os óleos essenciais e os extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Apesar de as especiarias terem sido aproveitadas por seu perfume, sabor e propriedades conservantes desde a antiguidade, dentre os óleos essenciais, apenas o óleo de turpentina foi mencionado por historiadores gregos e romanos. A destilação como método de produção foi usada inicialmente no Oriente há mais de 2000 anos, sendo aperfeiçoada pelos árabes no século IX. Na Europa, seu uso só foi disseminado a partir do século XVI. A partir do século seguinte, seu preparo já era bem conhecido, quando se poderia encontrar facilmente cerca de 20 tipos diferentes. A primeira medida experimental de suas propriedades bacterianas foi empreendida por De la Croix, em 1881. Entretanto, no decorrer dos séculos XIX e XX, seu interesse terapêutico perdeu importância, diante de sua aplicação como aromatizante e como perfume. Nos dias atuais, seu principal uso na Comunidade

Européia é baseado nas indústrias alimentícias (aromatizantes), de perfumes e farmacêuticas (BURT, 2004).

Esses compostos são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides. Eles constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos. Os óleos essenciais possuem conhecidas propriedades antifúngicas e um potencial para aplicação como agentes antimicrobianos (FARIAS; LIMA, 2000). Tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% desses compostos possuem propriedades antifúngicas e 35%, propriedades antibacterianas (LIMA *et al.*, 2006; TRAJANO, 2008).

Os óleos essenciais podem ser compostos por mais de 60 constituintes individuais, e isto interfere diretamente na sua maior ou menor atividade biológica (LIMA *et al.*, 2006). Os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas, mas também possuem alguma atividade antifúngica (OLIVEIRA, 2007c). Sua atividade antisséptica é normalmente atribuída à presença, além dos compostos fenólicos, de aldeídos, e álcoois, tais como o citral, geraniol, linalol e timol, que têm alto poder antisséptico, superior ao próprio fenol (FENNER, 2006).

Várias propriedades farmacológicas dos óleos essenciais foram relatadas, e suas aplicações são diversas: no tratamento do câncer, por quimioprevenção e supressão tumoral; em doenças cardiovasculares, no tratamento da arteriosclerose e na prevenção de acidentes tromboembólicos; no combate a microorganismos, como bactérias, vírus e fungos; como antioxidantes, no combate aos radicais livres; como hipoglicemiantes, sendo excelentes adjuvantes no combate à diabetes; e como veículos para drogas de uso transdérmico (EDRIS, 2007; PEREIRA, 2006).

A avaliação das atividades biológicas dos óleos essenciais de algumas plantas revelou que alguns destes exibiam atividades antibacterianas, inseticidas e antifúngicas (SILVA *et al.*, 2008). Estes efeitos antimicrobianos são bastante conhecidos, porém seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Considerando o grande número de diferentes compostos químicos presentes nestes produtos, provavelmente sua atividade não é atribuída a um mecanismo específico,

mas por diversas ações sobre a estrutura dos microrganismos (TRAJANO, 2008). Dois mecanismos foram propostos até o momento para explicar a ação dos componentes fenólicos na membrana celular: o primeiro define que essas moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo-proteína; o segundo defende que pode haver uma interação direta de compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas de membrana (BURT, 2004). A presença de óleos essenciais interfere também com o mecanismo de reparo necessário para a divisão celular dos microrganismos. Sendo assim, pode-se dizer que os óleos essenciais agem contra os microorganismos atuando sobre sua membrana, promovendo sua ruptura (FARIAS; LIMA, 2000).

É fácil justificar o crescente interesse científico sobre a ação antimicrobiana desses compostos: vários antibióticos sintéticos apresentam efeitos colaterais e espectro de ação limitada (MITSCHER *et al.*, 1972). Além disso, é um fato preocupante o aparecimento de microorganismos multirresistentes em ambientes hospitalares e na comunidade, sugerindo-se a aplicação desses componentes para tal fim (FARIAS; LIMA, 2000; EDRIS, 2007).

Dada a importância de alguns desses óleos e o escasso estudo sobre suas possibilidades de uso, mostra-se interessante aumentar o conhecimento sobre suas concentrações inibitórias, buscando-se o equilíbrio entre aceitabilidade e eficácia antimicrobiana (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

### **2.3 *Citrus limon***

Considerando-se os pontos já abordados, o interesse dessa pesquisa recairá sobre uma planta com inúmeras propriedades farmacológicas, encontrada sobre larga extensão no território brasileiro: *Citrus limon*.

O limão é o fruto do limoeiro (*Citrus x limon*), uma árvore da família *Rutaceae*, cujas folhas e frutos são aproveitados com fins terapêuticos (CEDRO, 2002). Também conhecido como limão verdadeiro, ele é originário da região sudeste da Ásia (PENIDO; SILVA, 2007). Seu uso farmacológico remonta da antiguidade, e

indicações que lhe eram atribuídas nessa época são confirmadas por estudos atuais (ARIAS; RAMÓN-LACA, 2005).

Os frutos possuem forma oblonga, com casca amarela e esponjosa, rica em óleo essencial – o Limoneno. Quando verdes, são mais ricos em óleo essencial, e sua espremedura manual ainda produz um óleo de melhor qualidade que os métodos mais recentes de destilação. Também é uma fruta rica em ácido cítrico, málico e oxalílico, além de vitamina C, que atua notadamente no metabolismo do cálcio, particularmente durante a gravidez, apresentando enorme eficácia sobre o escorbuto, estomatites e periodontopatias (ALMEIDA, 1993; SELLAR, 2002; SILVA, 2002).

Os constituintes químicos do óleo essencial de *C. limon* são linalol (álcool), citral, citronelal, felandrina, hidrocarbonetos terpênicos, limonina, limoneno, ácidos orgânicos (cítrico e málico), bioflavonóides (hespiridina), pectinas, vitamina A (retinol), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), niacina, sais minerais (potássio, fósforo, ferro, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, cloro) e vitamina C (ácido ascórbico). Possui diversas ações terapêuticas conhecidas na medicina popular: adstringente, alcalinizante do sangue e da urina, antianêmica, antibiótica, antisséptica, antiemética, antidepressiva, antiescorbútica, antiinflamatória, antiespasmótica, antitérmica, bactericida, diaforética, depurativa, diurética, expectorante, sedativa, sudorífera e vermífuga (AGRA *et al.*, 2007; FENNER, 2006; PENIDO, 2007; LUZ, 2001; REZENDE; COCCO, 2002; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; VIEIRA, 1992). Tem importância comercial também devido a seu uso na indústria dos licores, da perfumaria e confeitaria (ALMEIDA, 1993).

No domínio da Odontologia, há inúmeros relatos sobre os efeitos benéficos de *C. limon*: já foi advogado seu uso para tratamentos de gengivite e úlceras bucais (SANDHU; HEINRICH, 2005). Malta Júnior (1999) enfatizou a disseminação de seu uso popular para combater diversas afecções orais, como está descrito no quadro 1:

| Indicações                           | Parte da planta | Preparação | Posologia                                                                                                             |
|--------------------------------------|-----------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Estomatites                          | Fruto           | Suco       | Uso interno: tomar o suco da fruta.<br>Uso externo: suco da fruta sob a forma de colutório, dissolvido em água morna. |
| Herpes                               | Fruto           | Suco       | Usar sob a forma de colutório.                                                                                        |
| Tumores e cistos                     | Casca do fruto  | Chá        | Utilizar sob a forma de bochechos.                                                                                    |
| Ulcerações por próteses mal adaptada | Folhas          | Decocto    | Lavar a boca com um cozimento de folhas de batata doce e em seguida lavar com o suco de limão.                        |

Quadro 1: Usos medicinais de *C. limon* segundo tradição popular.

Fonte: Malta Júnior; A., 1999.

Sua ação antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida* já foi comprovada cientificamente em um estudo com pacientes HIV-positivos (WRIGHT *et al.*, 2009). Além disso, já foi relatado um efeito cicatrizante sobre lesões resultantes do herpes simples em 50% dos casos (CEDRO, 2002). Nos relatos da atividade antifúngica conferida a *Citrus Limon*, esta propriedade sempre está relacionada a alguns de seus componentes químicos, como o óleo essencial e flavonóides.

O óleo essencial do limão apresenta efetiva ação inibitória sobre diversas leveduras, fato este confirmado por diversos trabalhos científicos (ARAÚJO, 2005; FENNER, 2006; LIMA *et al.*, 2006; REZENDE; COCCO, 2002). Vendruscolo (2005) realizou uma revisão de literatura dos dados químicos de espécies usadas com fins terapêuticos, confirmando a ação inibitória do óleo volátil de *C. limon* no crescimento de *C. albicans*. Na composição do óleo essencial de *C. limon*, está presente, dentre outras, uma substância denominada xantolina, que é provida de atividade antifúngica contra diversas espécies, dentre as quais algumas leveduras do gênero *Candida* (LIMA *et al.*, 1995).

O óleo essencial de *C. limon* possui, em sua composição, numerosos componentes que podem atuar de maneira isolada ou em associação, sendo, assim, responsáveis por sua maior ou menor atividade biológica. São eles: monoterpenos ( $\alpha$ -thujene,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, canfeno, mirceno,  $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$  e  $\gamma$ -terpinene, limoneno, terpinoleno,  $\beta$ -ocimeno, p-cimeno, 3-careno); monoterpenos oxigenados (hidrato de sabineno, linalol, endo-fenchol, cânfora, citronelol, borneol, terpin,  $\alpha$ -perilla álcool, terpineol, nerol, neral, carvona, geraniol, geranial, citronelol, cadineno, timol); sesquiterpenos ( $\sigma$ -elemeno, E-caryophellene,  $\alpha$ -trans-bergamoteno,  $\alpha$ -humuleno, E- $\beta$ -farneseno,  $\gamma$ -curcumeno, valencene, biciclogermacreno,  $\alpha$ -muurolene,  $\alpha$  e  $\gamma$ -bisaboleno); sesquiterpenos oxigenados (álcool caryophellene, germacreno,  $\alpha$ -muurolol,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -bisabolol, E-farnesol); e outros componentes oxigenados, como o ácido palmítico e ácido linoléico (FERHAT *et al.*, 2007; LOTA *et al.*, 2002). Tampieri *et al.* (2005), em uma análise da composição do óleo essencial de *C. limon* encontrou resultado semelhante, descrevendo cerca de 40 fitoconstituintes, sendo os mais comuns o limoneno (62,9%), o  $\beta$ -pineno (11,2%) e o  $\gamma$ -terpinene (8,94%).

A complexa composição do óleo essencial mascara as ricas propriedades de cada um de seus fitocomponentes: citral e mirceno têm reconhecida ação antimicrobiana, e o  $\beta$ -pineno vem sendo estudado quanto à sua atividade inibitória sobre alguns tipos de bactérias e fungos, particularmente no tangente a *C. albicans*; o p-cimeno,  $\alpha$ -Terpinene e  $\gamma$ -Terpinene mostraram boa atividade de inibição sobre *C. albicans*, bem como o perilla álcool; geraniol e  $\beta$ -citronelol, nerol e linalol apresentaram os melhores resultados contra as leveduras em questão (SOUZA *et al.*, 2005; TAMPIERI *et al.*, 2005). A ocorrência de fitoconstituintes que não apresentam nenhuma atividade antifúngica (cariofileno e eucaliptol) poderia sugerir que, em algumas situações, determinados fitocomponentes restringem suas atividades antimicrobianas, agindo em sinergismo com outros constituintes, quando na forma de extratos, óleos essenciais, decoctos, etc. (SOUZA *et al.*, 2005).

Já os flavonóides, encontrados principalmente nas cascas dos frutos cítricos, se apresentam como importantes agentes de defesa contra fungos e outros microrganismos (DEL RIO *et al.*, 2004; JOHANN, 2003; JOHANN *et al.*, 2007).

Na Odontologia, o uso terapêutico de *Citrus limon* pode-se mostrar de grande valia, tendo-se em conta suas diversas ações – antisséptica, antimicrobiana, antiinflamatória - motivando ainda mais as pesquisas a seu respeito. Mais ainda, tomando-se a importância clínica das infecções fúngicas na cavidade oral, é plenamente justificável o estudo da ação antimicótica dos princípios ativos dessa planta, bem como seu uso consciente, a fim de instituir um protocolo de uso seguro (FRANÇA *et al.*, 2008). Oliveira *et al.* (2007b) constataram em seu trabalho o uso de *C. limon* para o tratamento de afecções bucais na forma de infuso, utilizando o fruto maduro para tal fim. Ele também relata que, embora esta e outras plantas venham sendo submetidas a alguns ensaios na área de Odontologia, ainda faltam estudos científicos que comprovem o seu uso efetivo nas afecções orais.

Tendo por base o interesse que cerca essa espécie vegetal, fica claro que sua importância nos âmbitos científico e comercial tende a aumentar. Isso justifica o desenvolvimento de estudos aprofundados sobre *C. limon*, notadamente no tocante a sua atividade antifúngica, para que todas as suas propriedades farmacológicas possam ser revertidas em prol da humanidade.

## 2.4 Fungos

Os fungos são microrganismos eucarióticos mais complexos, quando comparados às bactérias e aos vírus. Possuem espessa parede constituída por quitina e polissacarídeos, além de uma membrana celular, cujo principal componente é o ergosterol. Essas características peculiares tornam-nos naturalmente mais resistentes aos antimicrobianos utilizados no combate às infecções causadas por bactérias (FARIAS; LIMA, 2000; SOUZA *et al.*, 2004).

Há mais de 100.000 fungos conhecidos, mas poucos invadem os tecidos humanos. Estes fungos são comumente saprófitas do solo e da vegetação, sendo a transmissão de pessoa para pessoa bastante rara (ALMEIDA; SCULLY, 2002). No organismo do hospedeiro, em condições normais, estes microrganismos comportam-se de forma não-patogênica. No entanto, em situações de imunossupressão ou alterações sistêmicas, alguns assumem o comportamento de patógenos, causando manifestações infecciosas, que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (BUDTZ-JORGENSEN,

1990). Assim, são denominados fungos oportunistas, que podem ser classificados em filamentosos e leveduriformes. Os primeiros, quando dispersos pelo ar, podem ser deglutidos ou implantados traumáticamente em hospedeiros susceptíveis, iniciando a infecção. Já as leveduras usualmente são colonizadoras da pele, do trato gastrointestinal e de mucosas, vivendo como organismos comensais, e deste grupo fazem parte os representantes do gênero *Candida*. Os fungos leveduriformes são mais resistentes do que os do tipo filamentoso (FARIAS; LIMA, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

Os fungos também fazem parte da microbiota normal da boca. Variações qualitativas e quantitativas desses são encontradas em indivíduos saudáveis. As leveduras do gênero *Candida* podem provocar, através de parasitismo ocasional, uma infecção endógena, de ocorrência bastante comum na cavidade oral chamada de candidose ou candidíase. Esta é uma infecção oportunista superficial, com fatores locais e sistêmicos que facilitam o desenvolvimento da doença. Os fatores predisponentes incluem xerostomia, próteses, tabagismo, nutrição, antibióticos, diabetes, imunodeficiências associadas à corticoterapia, quimioterapia, lesões em tecidos moles, câncer, transplantes, deficiências de leucócitos e distúrbios endócrinos. (ALMEIDA; SCULLY, 2002; GREENBERG *et al.*, 2008; JORGE *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 2001; SAMARANAYAKE; KEUNG LEUNG; LIJIAN JIN, 2009).

O gênero *Candida* compreende cerca de 150 espécies. Dentre estas, sete representantes são reconhecidas como patógenos importantes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*. A *C. albicans* é a espécie mais importante, do ponto de vista etiológico, e é normalmente o comensal mais encontrado na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, em porcentagens que vão de 33 a 60% (ARAÚJO *et al.*, 2005; JORGE *et al.*, 1997; MESQUITA *et al.*, 1998). Também pode produzir lesões que acometem tipicamente pacientes portadores de doenças malignas crônicas e/ou degenerativas, transplantados, usuários de antimicrobianos e corticóides por tempo prolongado e imunodeprimidos, como os portadores de HIV (FARIAS; LIMA, 2000; SVETAZ *et al.*, 2007). Desde o início da epidemia do vírus da AIDS, é freqüentemente observado o comprometimento da cavidade oral e dos tecidos periodontais. Formas graves da doença periodontal são encontradas em indivíduos com esta infecção, entre elas o

eritema gengival linear, gengivite necrosante ulcerativa (NUG), periodontite necrosante ulcerativa (NUP) e doenças como a candidíase, leucoplasia pilosa e úlceras, dentre outras (CHIRINOS *et al.*, 2008; SAMARANAYAKE; KEUNG LEUNG; LIJIAN JIN, 2009).

No que tange os portadores de próteses totais ou parciais, pode-se observar a associação entre a candidíase e a prótese, sendo esta afecção denominada estomatite protética. Ela consiste em uma lesão eritematosa observada no palato duro sob uma prótese mucossuportada, que tem causa multifatorial, sendo a candidíase o fator primordial no seu surgimento (GREENBERG *et al.*, 2008; SCALERCIO *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 1999). Em levantamento feito na literatura, a estomatite protética mostrou-se como um dos problemas mais comuns em portadores de próteses dentárias (BONFIM *et al.*, 2008; MOREIRA, A.C. *et al.*, 2001; PENHA *et al.*, 2000), e as candidíases geralmente associadas a ela não são de fácil tratamento, sendo comum a recidiva após a interrupção da quimioterapia. Isso representa um desafio na prática estomatológica, em face da frequência da infecção e o pequeno número de drogas antifúngicas disponíveis em nosso meio (BATISTA *et al.*, 1999). Melo *et al.* (1999) avaliaram em seu trabalho 123 pacientes portadores de próteses mucossuportadas com manifestações clínicas de estomatite associadas às mesmas, comparando com os achados micológicos da mucosa palatina, comprovando a presença de *Candida*, particularmente da espécie *albicans*. No entanto, outras espécies também foram encontradas, tais como *C. tropicalis*, *C. torulopsis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. parasilosis* e *Rhodotorula rubra*, em menor grau. Estes achados são confirmados por outros estudos feitos com pacientes que apresentam diferentes fatores predisponentes para o aparecimento de candidoses bucais, entre eles o uso de próteses mucossuportadas (JORGE *et al.*, 1997; PENHA *et al.*, 2000; SAMARANAYAKE; KEUNG LEUNG; LIJIAN JIN, 2009).

O gênero *Candida* apresenta espécies que podem se apresentar sob forma de leveduras (inócuas) ou hifas (patogênicas). Dependendo das condições ambientais, como pH, temperatura e reservas nutricionais, alteram seu fenótipo, formando pseudo-hifas, passando de blastoconídeos para crescimento micelial. Também podem se desenvolver como hifas verdadeiras e clamidoconídeos. São caracterizadas primariamente pela morfologia colonial em meio de cultura agar Sabouraud e formação de tubo germinativo. Seu crescimento é favorecido em

temperaturas que variam de 20 a 38° C. As células leveduriformes possuem formato esférico, medindo 3 a 5 µm de diâmetro (LACAZ *et al.*, 2002). A *C. albicans* pode se apresentar sob várias formas, chamadas de variações adaptativas, sendo a forma de hifa a mais virulenta e a mais aderente, quando comparada à célula leveduriforme. Dessa forma, a capacidade dessa espécie de formar tubos germinativos parece contribuir para sua virulência. (HANNULA *et al.*, 2000; ALMEIDA; SCULLY, 2002).

Assim como outras espécies de leveduras, as do gênero *Candida* secretam enzimas proteolíticas que podem degradar ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro, induzindo uma disfunção ou uma destruição física, sendo que a invasão das células dos tecidos do hospedeiro por tais micro-organismos implica na penetração e danos ao envelope externo celular, sendo esse processo mediado por meios físicos e enzimáticos, ou pela combinação de ambos (SALYERS; WITT, 1994; ALMEIDA; SCULLY, 2002). Estes achados podem explicar a razão de estruturas fúngicas não serem detectadas nos exames citológicos da grande maioria dos esfregaços obtidos da mucosa do palato, e sim constituírem achados freqüentes nos espécimes obtidos da superfície interna das próteses totais (SCALERCIO *et al.*, 2007).

## 2.5 Antifúngicos

De forma convencional, o tratamento das candidoses bucais é feito através do uso de agentes antimicóticos sintéticos, tópicos e/ou sistêmicos, sendo os derivados azólicos e os poliênicos os mais comuns, associado a medidas que visam melhorar a imunidade celular. Dentre os compostos poliênicos, destacam-se a nistatina e a anfotericina-B, e, dentre os compostos azólicos, os mais utilizados são o miconazol, cetoconazol, e, mais recentemente, os triazólicos fluconazol e itraconazol (JORGE, 1998; GREENBERG *et al.*, 2008).

A maioria das micoses responde bem à terapia tópica ou sistêmica com polienos ou azóis. Em geral, a administração oral de drogas em infecções fúngicas foi revolucionada pelo grupo dos triazóis, fluconazol e itraconazol, apesar de relatórios recentes indicarem um aumento alarmante de organismos resistentes, em especial ao fluconazol (SAMARANAYAKE; KEUNG LEUNG; LIJIAN JIN, 2009), particularmente em pacientes portadores de HIV (GREENBERG *et al.*, 2008). A

eficácia limitada das drogas antifúngicas disponíveis contra os microorganismos causadores de micoses severas, principalmente em pacientes imunodeprimidos, está ligada ao desenvolvimento rápido de microorganismos resistentes, diminuindo a capacidade terapêutica dessas substâncias (SVETAZ *et al.*, 2007). Apesar do aumento do número de antimicóticos comercialmente disponíveis nos últimos anos, esses ainda se encontram em minoria, quando comparados ao contingente de drogas antibacterianas. Além disso, a resistência aos antifúngicos convencionais tem representado um grande desafio para a clínica (BATISTA *et al.*, 1999).

O tratamento convencional para as doenças fúngicas é muito limitado, particularmente devido ao espectro limitado dos antifúngicos atuais, e por conta do alto custo do tratamento, ainda mais quando se necessita de um uso mais prolongado. Esses fatores vêm encorajar a adoção de novas terapêuticas, dentre elas, o uso mais extenso de produtos naturais (SILVA *et al.*, 2008). Um estudo realizado com plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica relacionou 409 espécies utilizadas no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas (FENNER *et al.*, 2006). No tocante ao uso de plantas no tratamento de micoses, outro estudo realizado com fitoterápicos brasileiros de ação antifúngica observou que a *C. albicans* foi o fungo mais sensível à ação das plantas medicinais, correspondendo a 72,6% (ARRUDA, 2006).

Os medicamentos antifúngicos têm sua forma de ação baseada em alguns componentes estruturais dos fungos, ou em uma via metabólica definida dos mesmos. Atuam por diferentes mecanismos, como pela alteração da permeabilidade, lesão da parede celular, desnaturação das moléculas protéicas e de ácidos nucléicos, inibição da atividade enzimática, entre outros (ARRUDA, 2006). Os óleos essenciais, por sua vez, agem contra os microorganismos promovendo a ruptura de sua membrana (FARIAS; LIMA, 2000).

Algumas condições podem influenciar a eficiência dos agentes antimicrobianos, dentre elas: dimensão e composição da população microbiana; concentração ou intensidade do agente microbiano; tempo de exposição à droga; temperatura; condições do ambiente local (LIMA *et al.*, 2006).

Os principais alvos úteis para a ação desses agentes sintéticos são (ARRUDA, 2006):

- Esteróides de membrana;
- Parede celular;
- Síntese de RNA e DNA;
- Topoisomerases fúngicas.

Apesar da disponibilidade de tal multiplicidade de agentes terapêuticos, o fracasso não é incomum. Na boca, o efeito diluente da saliva e a limpeza promovida pela ação da musculatura oral tendem a reduzir a disponibilidade do antifúngico, deixando-a abaixo da concentração terapêutica eficaz. Além do mais, biofilmes contendo *Candida*, nas mucosas e em superfícies inertes, como próteses, que resistem à perfusão do antifúngico, também podem contribuir para a falha terapêutica. Finalmente, a administração freqüente de medicamentos e efeitos adversos associados, juntamente com imunodeficiência subjacente possível e a emergência da resistência às drogas, também podem prejudicar terapia, levando à repetição crônica da doença (SAMARANAYAKE; KEUNG LEUNG; LIJIAN JIN, 2009).

Sendo assim, é crescente o número de estudos que apontam para o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais (JORGE, 1998), e, considerando a grande importância clínica dada às micoses, faz-se mister estudar de forma mais aprofundada o potencial antifúngico existente em compostos oriundos em espécies vegetais, ditas medicinais. Importa que sejam antifúngicos potentes e possam ser usados para a produção de fármacos eficientes, seguros, estáveis e com pouca ou nenhuma toxicidade (ARRUDA, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local do Estudo

As análises referentes ao estudo da atividade antifúngica dos produtos naturais selecionados foram realizadas no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

#### 3.2 Período

Os ensaios tiveram início em agosto de 2008, sendo concluídos em abril de 2009.

#### 3.3 Produto Testado

O óleo essencial de *C. limon* utilizado nos ensaios biológicos foi selecionado conforme as informações registradas na literatura e uso na medicina natural ou popular.



Figura 1 - *Citrus limon* Linn.  
Fonte: Penido; Silva, 2007.

O óleo essencial utilizado nos ensaios microbiológicos foi adquirido da Empresa FERQUIMA-Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista/São Paulo). O produto veio acompanhado de um Boletim Técnico, contendo as informações do processo de extração do óleo, seguindo a técnica padrão adotada – Hidrodestilação (MATOS, 1988; CRAVEIRO, 1981), e também informações sobre o aspecto, cor, impureza, odor, densidade e índice de refração (20°C), validando a qualidade do produto.

Para os ensaios microbiológicos para avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial, o mesmo foi testado *in natura* na quantidade de 20 µL/disco. E nos ensaios para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM, o óleo essencial foi preparado conforme o protocolo de Allegrini *et al.*, 1973. Em um tubo de ensaio (100x10mm) esterilizado, foi adicionado 30 µL/3 mL (correspondendo a 10.000 µg /mL) e duplamente concentrado. Foi adicionado 0,12 mL (ou 120 µL) de Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira), e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada esterilizada, correspondendo a uma concentração inicial de 10.000 µg/mL.

### 3.4 Produto Sintético

Para o controle de avaliação da atividade antifúngica do produto, foi utilizado como padrão o antifúngico miconazol (50 µg/mL), sendo obtido na Farmácia de Manipulação DILECTA / João Pessoa / Paraíba.

### 3.5 Cepas Utilizadas

No estudo foram incluídas 22 leveduras do gênero *Candida*:

- *Candida albicans* ATCC-90028
- *Candida albicans* ATCC-76615
- *Candida albicans* ATCC-76485
- *Candida albicans* ICB-12
- *Candida albicans* LM-MD37
- *Candida albicans* LM-968
- *Candida albicans* LM-18

- *Candida albicans* LM-68
- *Candida guilliermondii* LM-U70
- *Candida guilliermondii* LM-01
- *Candida guilliermondii* LM-070
- *Candida guilliermondii* LM-708
- *Candida krusei* ATCC-6258
- *Candida krusei* ATCC-6538
- *Candida krusei* LM-120
- *Candida krusei* LM-08
- *Candida tropicalis* ATCC-13803
- *Candida tropicalis* LM-01
- *Candida tropicalis* LM-028
- *Candida tropicalis* LM-0708
- *Candida tropicalis* LM-14
- *Candida tropicalis* LM-759

As cepas foram adquiridas no Laboratório de Micologia da Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidas em meio de cultura adequado Agar Sabouraud Dextrose-ASD (DIFCO Laboratories Co./USA/France) a 4°C e a temperatura ambiente (28-30°C).

### 3.6 Suspensão dos Microrganismos – Inóculo

Para a preparação das suspensões dos microrganismos (inóculo), as cepas de *Candida* selecionadas, foram mantidas em ASD, durante 24-48 horas a 35°C. O inóculo foi preparado e padronizado em solução fisiológica a 0,9 % (Fresenius Kabi/Ceará) esterilizada, contendo Tween 80 (1%). A mesma foi comparada com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da Escala Mc Farland. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Fanem) durante 2 minutos, a suspensão foi ajustada para 90% de transmitância no espectrofotômetro (Leitz-photometer 340-800), para conter cerca de  $10^6$  UFC/mL (BAUER *et al.*, 1966; CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

### 3.7 Meios de Cultura

Os meios de cultura usados na manutenção dos microrganismos e nos ensaios microbiológicos foram: ágar e caldo Sabouraud dextrose-ASD (fungos), adquiridos da DIFCO Lab. Co. (Detroit) e preparados conforme as instruções do fabricante.

### 3.8 Metodologia

O estudo consiste numa pesquisa do tipo experimental, feita em duas etapas, para identificação das propriedades biológicas do óleo essencial de *C. limon*. A pesquisa foi feita mediante a realização de ensaios, em fases sequenciais e conexas, sendo a primeira etapa destinada à determinação da CIM e da CFM do produto natural testado.

A segunda etapa consistiu no ensaio para determinação da interferência do O.E. de *C. limon* sobre a viabilidade das cepas fúngicas (estudo da cinética de morte microbiana), e avaliação das alterações morfológicas decorrentes da ação da CIM do produto sobre leveduras do gênero *Candida* (estudo da interferência do óleo essencial sobre a morfologia das cepas fúngicas).

O estudo da atividade microbiológica de *C. limon* (limonene) foi feito pelo método de diluição em meio líquido (microdiluição) frente a leveduras do gênero *Candida*, conforme os protocolos de rotina para ensaios de atividade antimicrobiana (CLEELAND; SQUIRES, 1991; BAUER *et al.*, 1966; ALLEGRIINI *et al.*, 1973; HADACEK; GREGER, 2000; COLOMBO *et al.*, 1995; NCCLS, 1997).

#### 3.8.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Técnica da Microdiluição

A determinação da CIM do produto estudado frente às espécies fúngicas testadas foi realizada através da técnica da Microdiluição em placa de 96 orifícios e

fundo em “U” com tampa, esterilizadas (INLAB/Indústria Brasileira). Nas citadas placas, distribuiu-se, inicialmente, 100 µL de caldo Sabouraud, duplamente concentrado, a partir da primeira coluna (A) até a última (H). Em seguida, foram distribuídos 100 µL do óleo essencial selecionado, na concentração inicial estabelecida de 10.000 µg/mL, e duplamente concentrado, na primeira linha das cavidades- A até H. Em seguida, a partir da concentração inicial foram feitas as diluições seriadas à razão de 2 nas cavidades das linhas de 1 a 10, obtendo-se as concentrações de 10.000 até 0,018 µg/mL. As linhas 11 e 12 foram reservadas, respectivamente, para o antifúngico padrão miconazol (50 µg/mL) e para os controles de crescimento das leveduras.

O ensaio foi realizado em duplicata e incubado a 35-37 °C durante 24-48 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com leveduras, foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, foi adicionado 20 µL de cloreto de trifeniltetrazolium- TTC a 1% (SIGMA), reconhecido como indicador calorimétrico de óxido-redução para leveduras (GRABE, 1976; DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE *et al.*, 2005). Foi feita nova incubação a 35-37 °C. A leitura foi realizada visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo, através da formação de aglomerado de células (botão). Além disso, também se observou a mudança da solução transparente para vermelho ou róseo, indicando crescimento da levedura. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador.

Após a leitura dos resultados, foram feitos inóculos (10 µL) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Sabouraud (100 µL/cavidade) em placa de microdiluição esterilizadas (DISPOPETRI/Indústria Brasileira/90 X 15 mm) para a determinação da CFM. Após a incubação a 35 °C por 24 horas, foi adicionado 20 µL de TTC. Os ensaios foram incubados a temperatura de 35°C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies de *Candida*, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador.

### 3.8.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a determinação da CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas, bem como os controles positivos foram subcultivados em placas de agar Sabouraud dextrose, devidamente identificadas. Após 24 horas de incubação a 30°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM a menor concentração da substância que impediu crescimento visível do subcultivo.

### 3.8.3 Estudo da Cinética de Morte Microbiana

O estudo da interferência do óleo essencial do produto natural testado sobre a viabilidade das cepas fúngicas foi realizado através do método de contagem de células viáveis para os fungos leveduriformes. Neste ensaio, foi observado o comportamento das cepas de *C. albicans* ICB 12 e *C. tropicalis* ATCC 13803 à CIM determinada pelo método de Microdiluição. As cepas estudadas nesta etapa foram escolhidas dada a prevalência da espécie *C. albicans* na cavidade bucal, enquanto que, no segundo caso, a espécie escolhida apresentou maior resistência à droga natural testada neste estudo, demonstrando uma CIM maior que a média observada. Inicialmente, foi preparada a suspensão da levedura em solução salina a 0,9 %, conforme a turvação do tubo 0.5 da Escala Mc Farland, contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL. Recomenda-se fazer uma diluição para  $10^{-1}$  (1 mL : 9 mL) ou até  $10^{-2}$  (1 mL : 9 mL). Preparou-se uma série de tubos de ensaio de 150 x 15 mm contendo 9 ml de caldo Sabouraud esterilizado. Em seguida, adicionou-se o produto-teste preparado na CIM/2, CIM, CIM x 2, CIM x 4 e CIM x 8; como também do controle do antifúngico padrão miconazol. Da suspensão da levedura selecionada foram transferidos 1 mL para todos os tubos testes. As soluções testes permaneceram incubadas a 35°C por 24 horas, no decorrer do ensaio. Nos tempos predeterminados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas), uma alíquota de 10 µl das soluções testes e do controle da levedura foram inoculados sobre ágar Sabouraud dextrose em placas, para a determinação da contagem de colônias. O ensaio foi incubado a 35°C, durante 24/48 horas. O ensaio foi realizado em duplicata.

Após o tempo de incubação adequado, foi realizada a leitura dos resultados através da contagem das colônias crescidas. A média do número de colônias contadas ( $\log_{10}$  CFU/mL) foi marcada versus o tempo para cada cepa, e usada para comparar a média e a dimensão da atividade antifúngica em varias concentrações. A análise dos resultados para o produto teste foi considerada como atividade fungicida quando da observância de redução de morte microbiana  $\geq 99,9\%$  ( $\geq 3 \log_{10}$ ) e fungistática  $\leq 99,9\%$  ( $\leq 3 \log_{10}$ ) em UFC em consideração ao inóculo inicial. Os resultados foram apresentados sob a forma de gráfico de morte microbiana (RASOOLI; MIRMOSTAFA, 2006; ERNST *et al.*, 1996; KEELE *et al.*, 2001; KLEPSE *et al.*, 1998).

#### 3.8.4 Avaliação da interferência do produto sobre a morfologia das leveduras

Para a observação de alterações da morfologia de leveduras do gênero *Candida* foi empregada a técnica do microcultivo para leveduras, utilizando o meio sólido ágar-sabouraud em câmara úmida (KURTZMAN *et al.*, 1998; SIDRIM; MOREIRA, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; GUNGI *et al.*, 1983). As cepas envolvidas nesta etapa do estudo foram: *C. albicans* ICB 12, *C. tropicallis* ATCC 13803, *C. guilliermondii* LM 01 e *C. krusei* ATCC 6258.

O meio de cultura ágar-sabouraud (100 mL) foi preparado, sendo a quantidade total dividida em três partes de igual volume, às quais foram acrescentadas, respectivamente: o produto natural a ser testado, na quantidade correspondente à CIM; o antifúngico padrão-miconazol em concentração padrão (50  $\mu$ g); e água destilada, para o controle da levedura. O ensaio foi realizado em placas de petri 90 x 15 mm (DISPO PETRI/INTERLAB), contendo a lâmina sobre um suporte para o microcultivo, e papel de filtro (30 x 30 mm) embebido com água (câmara úmida), devidamente esterilizados. Em seguida, o meio de cultura contendo o produto teste na respectiva CIM, foi fundido, e 1mL foi transferido e espalhado sobre a lâmina, formando uma camada delgada. Após a solidificação do ágar-sabouraud, a levedura foi semeada com o auxílio de alça bacteriológica em forma de agulha, fazendo duas estrias paralelas. Recobriu-se o microcultivo com uma

lamínula e 1ml de água destilada e esterilizada para manter a umidade do sistema. A placa foi fechada e incubada a temperatura de 35°C durante 24/48 horas.

Decorrido o tempo de incubação, cada preparação foi examinada em microscópio óptico para a observação da formação ou não das estruturas características das leveduras, incluindo blastoconídios, pseudohifas, hifas e clamidoconídios.

### **3.9 Tratamento estatístico**

A técnica estatística empregada na análise dos dados foi uma estatística descritiva, e os resultados obtidos foram organizados em tabelas e gráficos.

## 4 RESULTADOS

Na tabela 1, estão registrados os resultados da Concentração Inibitória Mínima – CIM – do óleo essencial em estudo.

Observa-se que o óleo essencial de *C. limon* na concentração de 0,078µg/mL produziu inibição no crescimento de 16/22 (73%) das leveduras submetidas aos ensaios biológicos. Na concentração de 0,156 µg/mL, o produto apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de 18/22 (82%) das cepas de *Candida*. A figura 2 ilustra a leitura do resultado do ensaio de determinação da CIM do O.E. em estudo.

Ainda de acordo com a tabela 1, a cepa que apresentou maior resistência à ação antifúngica do óleo essencial foi *C. tropicallis* LM 0708, com CIM de 0,625 µg/mL, seguido pelas cepas de *C. tropicallis* ATCC13803, *C. albicans* LM 68 e *C. albicans* 968, todas com CIM de 0,312 µg/mL.

Os resultados podem ser considerados satisfatórios, pois a CIM do óleo essencial de *C. limon* estabelecida entre 0,078 e 0,156 µg/mL, tendo inibido, respectivamente, 73% e 82% das cepas de *Candida*, estando a concentração de 0,078 µg/mL dentro dos limites considerados excelente e bom, segundo estudos realizados anteriormente (HOLETZ *et al.*, 2002; HOUGHTON *et al.*, 2007; MITSCHER *et al.*, 1972).

No meio de controle, isento de óleo essencial do produto teste, verificou-se crescimento das cepas, caracterizando sua viabilidade em caldo Sabouraud.

Tabela 1 – Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM / n = 22) do óleo essencial de *C. limon* sobre espécies de *Candida* pela técnica de microdiluição.

| Óleo Essencial (µg/mL) | Espécies de <i>Candida</i> (n = 22) |                                    |                                    |                                |                                 |                                |                               |                               |                                      |                                     |                                      |                                      |                                 |                                 |                              |                             |                                      |                                 |                                  |                                   |                                 |                                  |
|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                        | <i>Candida albicans</i> ATCC 76615  | <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 | <i>Candida albicans</i> ATCC 76485 | <i>Candida albicans</i> ICB 12 | <i>Candida albicans</i> LM MD37 | <i>Candida albicans</i> LM 968 | <i>Candida albicans</i> LM 18 | <i>Candida albicans</i> LM 68 | <i>Candida guilliermondii</i> LM U70 | <i>Candida guilliermondii</i> LM 01 | <i>Candida guilliermondii</i> LM 070 | <i>Candida guilliermondii</i> LM 708 | <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 | <i>Candida krusei</i> ATCC 6538 | <i>Candida krusei</i> LM 120 | <i>Candida krusei</i> LM 08 | <i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803 | <i>Candida tropicalis</i> LM 01 | <i>Candida tropicalis</i> LM 028 | <i>Candida tropicalis</i> LM 0708 | <i>Candida tropicalis</i> LM 14 | <i>Candida tropicalis</i> LM 759 |
| 10.000                 | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | -                                 | -                               | -                                |
| 5.000                  | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | -                                 | -                               | -                                |
| 2.500                  | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | -                                 | -                               | -                                |
| 1.250                  | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | -                                 | -                               | -                                |
| 0,625                  | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | -                                 | -                               | -                                |
| 0,312                  | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | +                                 | -                               | -                                |
| 0,156                  | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | +                              | -                             | +                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | +                                    | -                               | -                                | +                                 | -                               | -                                |
| 0,078                  | -                                   | -                                  | +                                  | -                              | -                               | +                              | +                             | +                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | +                                    | -                               | -                                | +                                 | -                               | -                                |
| 0,038                  | +                                   | +                                  | +                                  | +                              | +                               | +                              | +                             | +                             | +                                    | +                                   | +                                    | +                                    | +                               | +                               | +                            | +                           | +                                    | +                               | +                                | +                                 | +                               | +                                |
| 0,018                  | +                                   | +                                  | +                                  | +                              | +                               | +                              | +                             | +                             | +                                    | +                                   | +                                    | +                                    | +                               | +                               | +                            | +                           | +                                    | +                               | +                                | +                                 | +                               | +                                |
| Controle com miconazol | -                                   | -                                  | -                                  | -                              | -                               | -                              | -                             | -                             | -                                    | -                                   | -                                    | -                                    | -                               | -                               | -                            | -                           | -                                    | -                               | -                                | -                                 | -                               | -                                |
| Controle da levedura   | +                                   | +                                  | +                                  | +                              | +                               | +                              | +                             | +                             | +                                    | +                                   | +                                    | +                                    | +                               | +                               | +                            | +                           | +                                    | +                               | +                                | +                                 | +                               | +                                |

+ Crescimento do microrganismo

- Inibição do crescimento do microrganismo

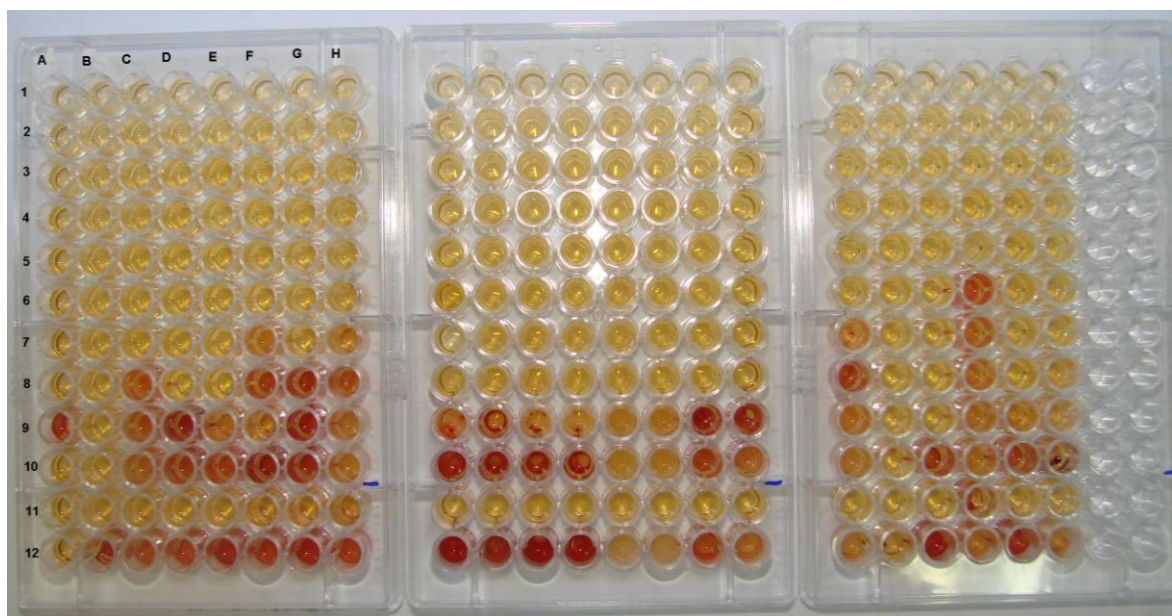


Figura 2 - Leitura do ensaio da determinação da CIM do óleo essencial de *C. limon*, pela técnica da microdiluição.

Com relação aos resultados da Concentração Fungicida Mínima (CFM), observou-se no ensaio que a mesma ficou estabelecida no intervalo de 0,078 a 1,250  $\mu\text{g/mL}$ , inibindo o crescimento total, respectivamente, de 14/22 (64%) e das demais (36%) cepas de *Candida* spp. Estes resultados estão registrados na tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM / n = 22) do óleo essencial de *C. limon* sobre espécies de *Candida* em placa de microdiluição.

| Óleo Essencial (µg/mL) | Espécies de Cândida (n = 22)         |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
|                        | <i>Candida albicans</i> : ATCC-90028 | <i>Candida albicans</i> : ATCC-76615 | <i>Candida albicans</i> : ATCC-76485 | <i>Candida albicans</i> : ICB-12 | <i>Candida albicans</i> : LM-MD37 | <i>Candida albicans</i> : LM-968 | <i>Candida albicans</i> : LM-18 | <i>Candida albicans</i> : LM-68 | <i>Candida guilliermondii</i> : LM-U70 | <i>Candida guilliermondii</i> : LM-01 | <i>Candida guilliermondii</i> : LM-070 | <i>Candida guilliermondii</i> : LM-708 | <i>Candida krusei</i> : ATCC-6258 | <i>Candida krusei</i> : ATCC-6538 | <i>Candida krusei</i> : LM-120 | <i>Candida krusei</i> : LM-08 | <i>Candida tropicalis</i> : ATCC-13803 | <i>Candida tropicalis</i> : LM-01 | <i>Candida tropicalis</i> : LM-028 | <i>Candida tropicalis</i> : LM-0708 | <i>Candida tropicalis</i> : LM-14 | <i>Candida tropicalis</i> : LM-759 |
| 10.000                 |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
| 5.000                  |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
| 2.500                  |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
| 1.250                  |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   | x                                  |                                     |                                   |                                    |
| 0,625                  |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
| 0,312                  |                                      |                                      |                                      |                                  | x                                 |                                  | x                               |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                | x                             |                                        |                                   |                                    |                                     | x                                 |                                    |
| 0,156                  |                                      |                                      | X                                    |                                  |                                   | x                                |                                 |                                 | x                                      |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
| 0,078                  | x                                    | x                                    |                                      | x                                | x                                 |                                  |                                 | x                               |                                        | x                                     | x                                      | x                                      | x                                 | x                                 | x                              |                               | x                                      | x                                 |                                    | x                                   |                                   |                                    |
| 0,038                  |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |
| 0,018                  |                                      |                                      |                                      |                                  |                                   |                                  |                                 |                                 |                                        |                                       |                                        |                                        |                                   |                                   |                                |                               |                                        |                                   |                                    |                                     |                                   |                                    |

Os resultados dos ensaios da cinética microbiana e a curva de morte de *C. tropicalis* ATCC 13803, mediante ação do miconazol e das diferentes concentrações do O. E. de *C. limon* estão representados no gráfico 1:

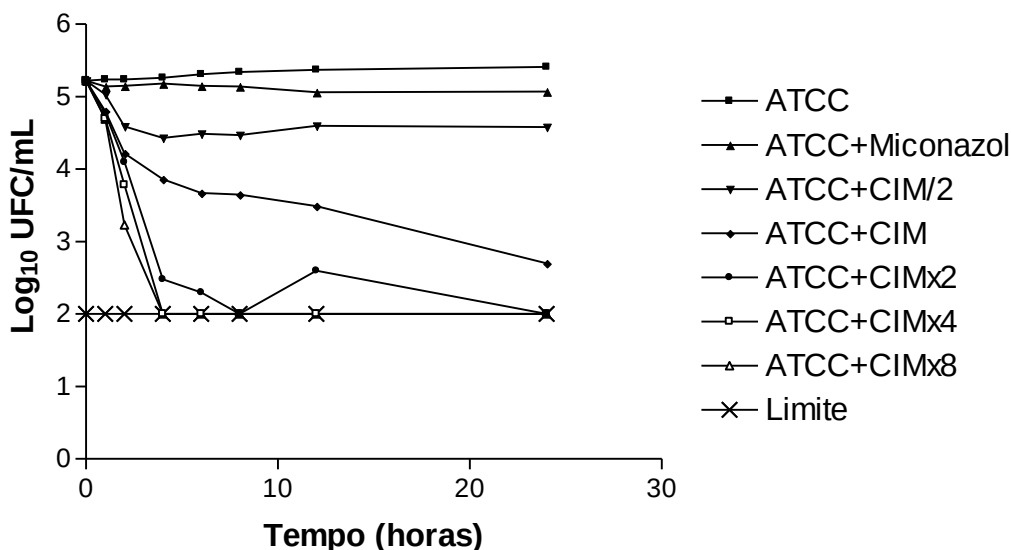


Gráfico 1 - Curva de morte microbiana (Log UFC/min) da cepa *C. tropicalis* ATCC 13803, sob ação do O. E. de *C. limon* e do miconazol.

Observou-se efeito fungicida do produto testado mais rapidamente nas concentrações de CIMx8 e CIMx4, após 4 horas de exposição da cepa. Na concentração de CIMx2 o produto demonstrou ação variável sobre a cepa testada, tendo havido inibição desta com aproximadamente 8 horas, seguindo-se um crescimento, e decrescendo definitivamente a partir de 12 horas sob a ação do produto natural.

As demais concentrações testadas não apresentaram ação fungicida perceptível no período estipulado para o estudo.

No gráfico 2 estão pontuados os resultados da cinética microbiana e a curva de morte de *C. albicans* ICB 12 mediante ação do O. E. de *C. limon*, nas diferentes concentrações propostas, e do miconazol. Os dados estão ilustrados nas figuras 3 a 7.

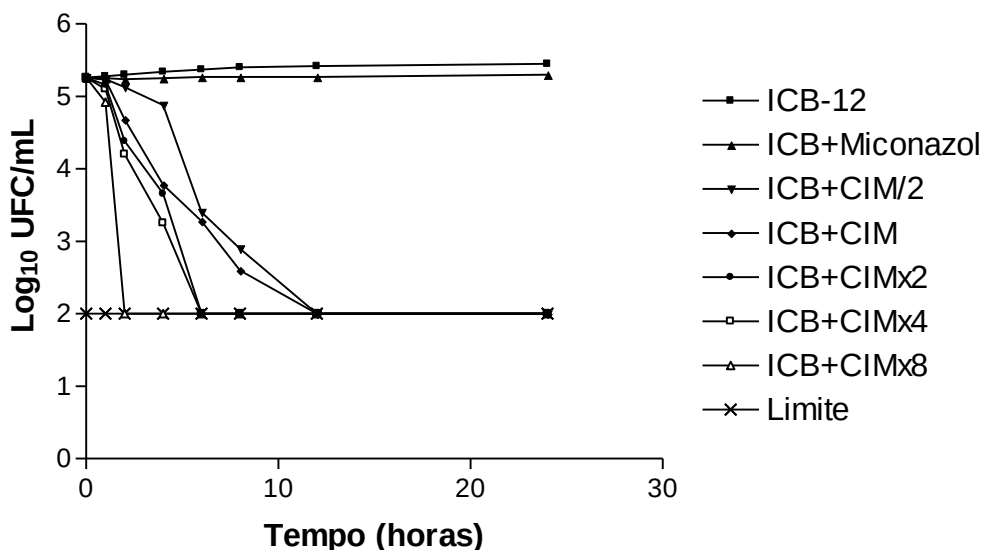


Gráfico 2 - Curva de morte microbiana (Log UFC/min) da cepa *C. albicans* ICB 12, sob ação do O. E. de *C. limon* e do miconazol.

Observou-se efeito fungicida do produto testado mais rapidamente na concentração de CIMx8 após aproximadamente 2 horas, seguido pelas concentrações de CIMx4 e CIMx2, ao fim de 6 horas de exposição ao produto.

O produto testado nas concentrações de CIM e CIM/2 levou mais tempo (cerca de 12 horas) para exercer sua ação fungicida sobre as leveduras expostas.

Os dados com relação ao ensaio utilizando o produto sintético miconazol, e o experimento realizado em meio livre de produtos-teste estão ilustrados, respectivamente, nas figuras 8 e 9.

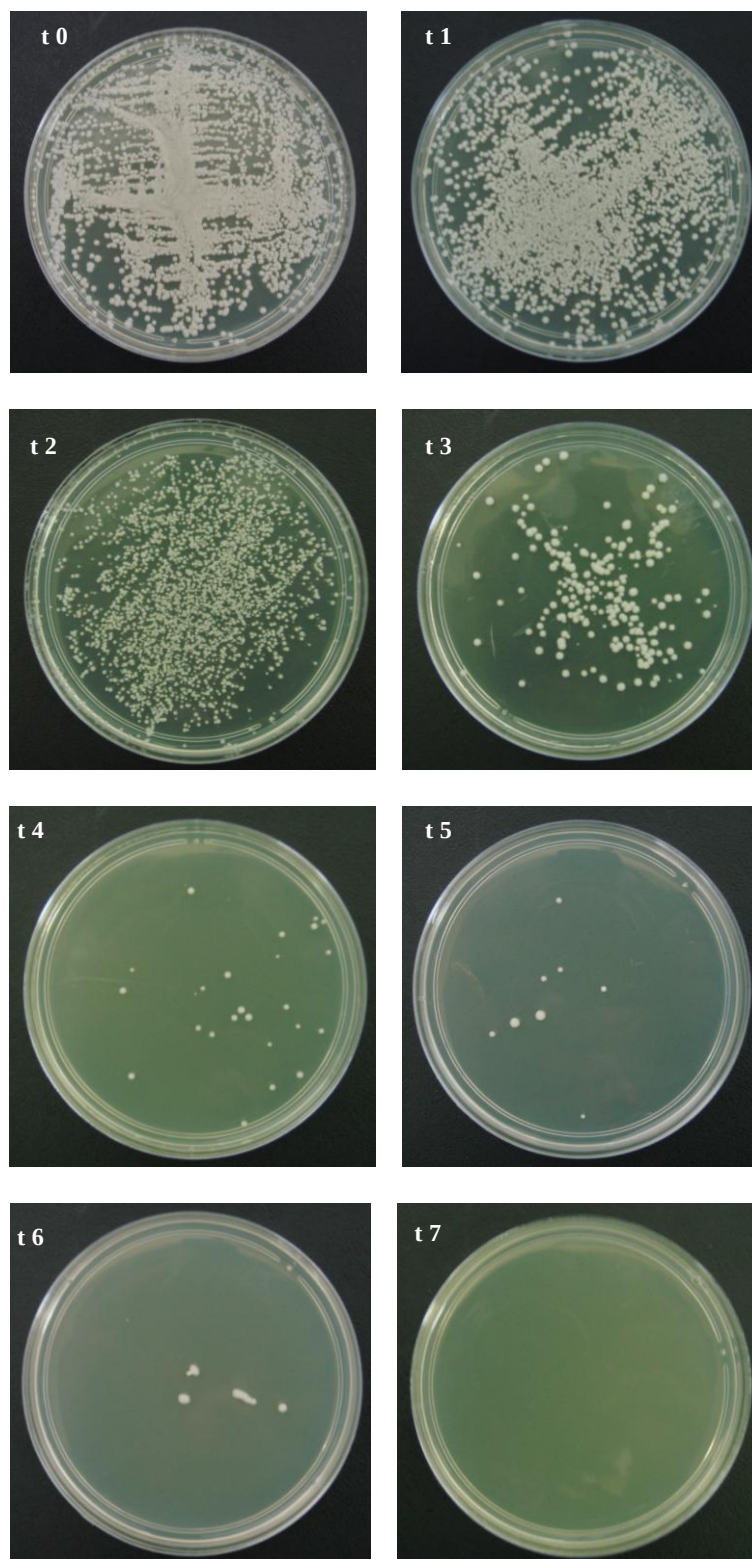


Figura 3 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do O. E. de *C. limon* na concentração de CIM/2 : t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

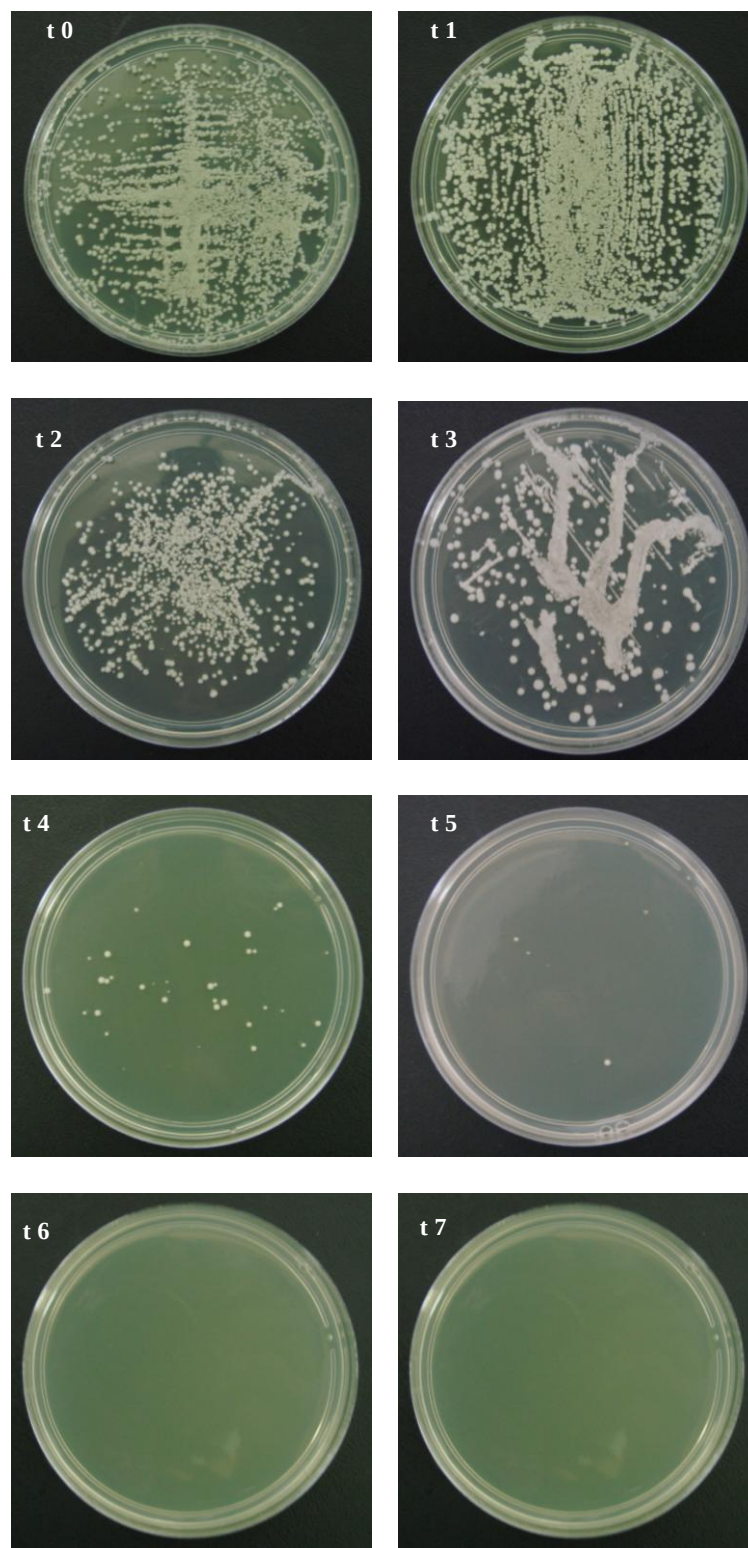


Figura 4 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do O. E. de *C. limon* na concentração de CIM: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

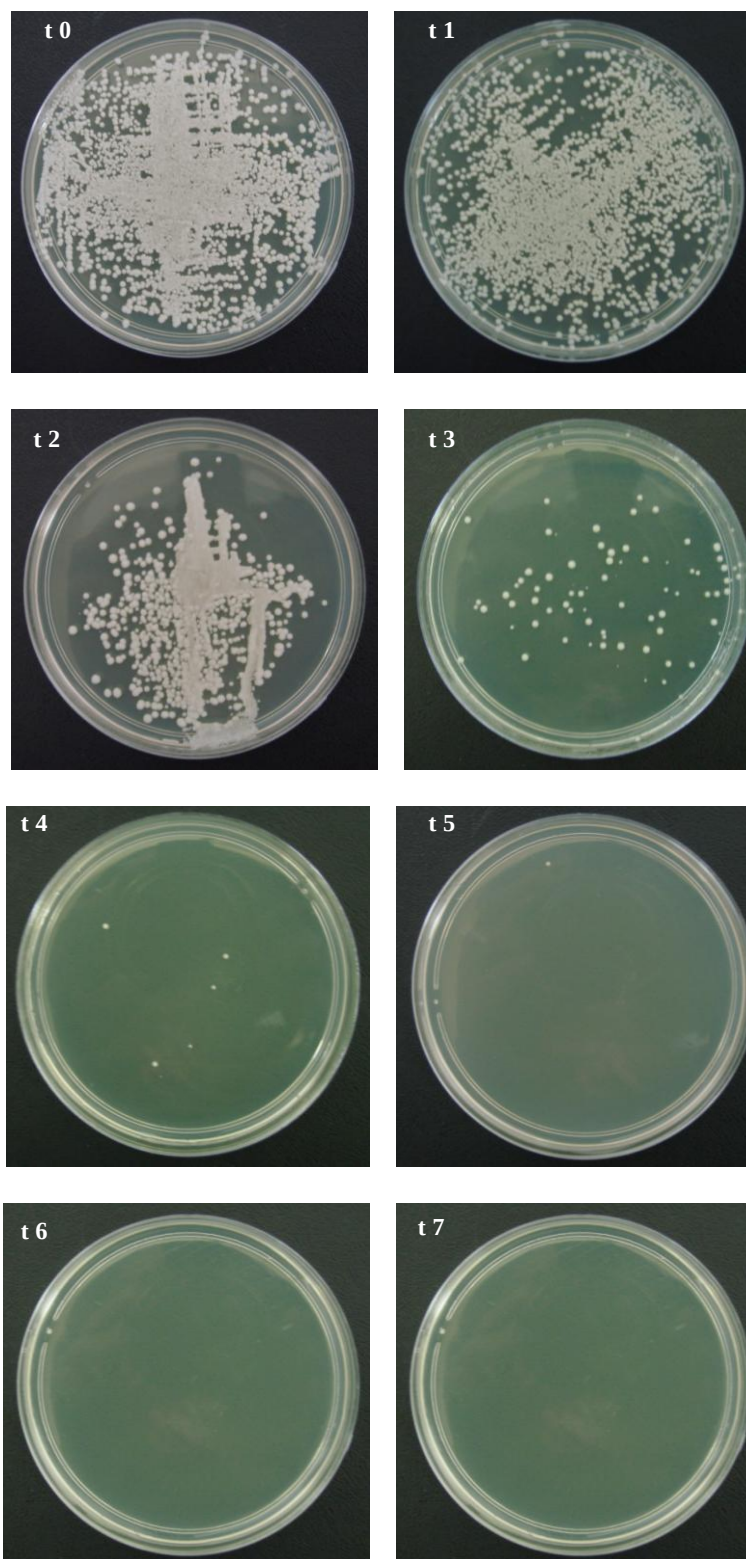


Figura 5 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do O. E. de *C. limon* na concentração de CIMx2: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

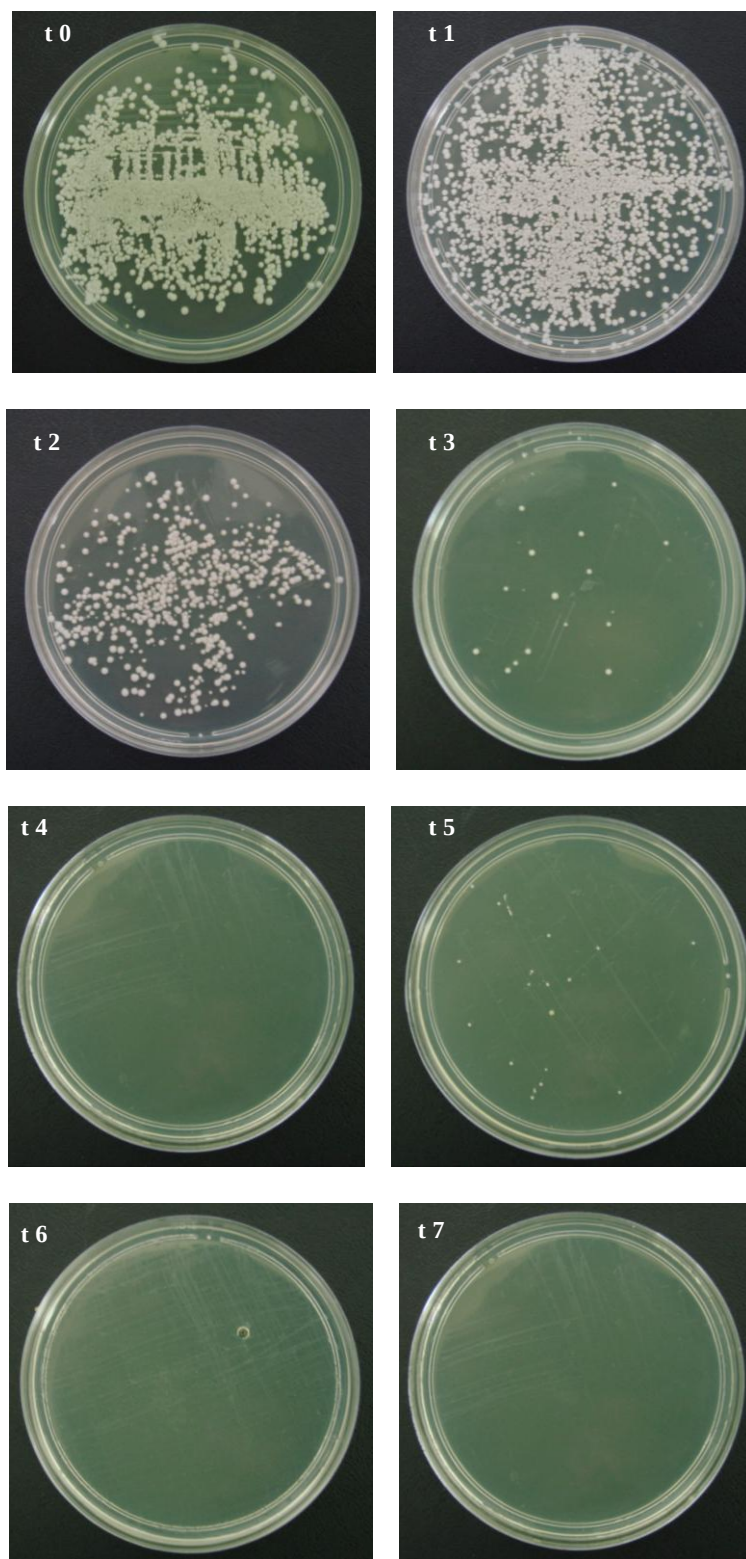


Figura 6 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do O. E. de *C. limon* na concentração de CIMx4: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

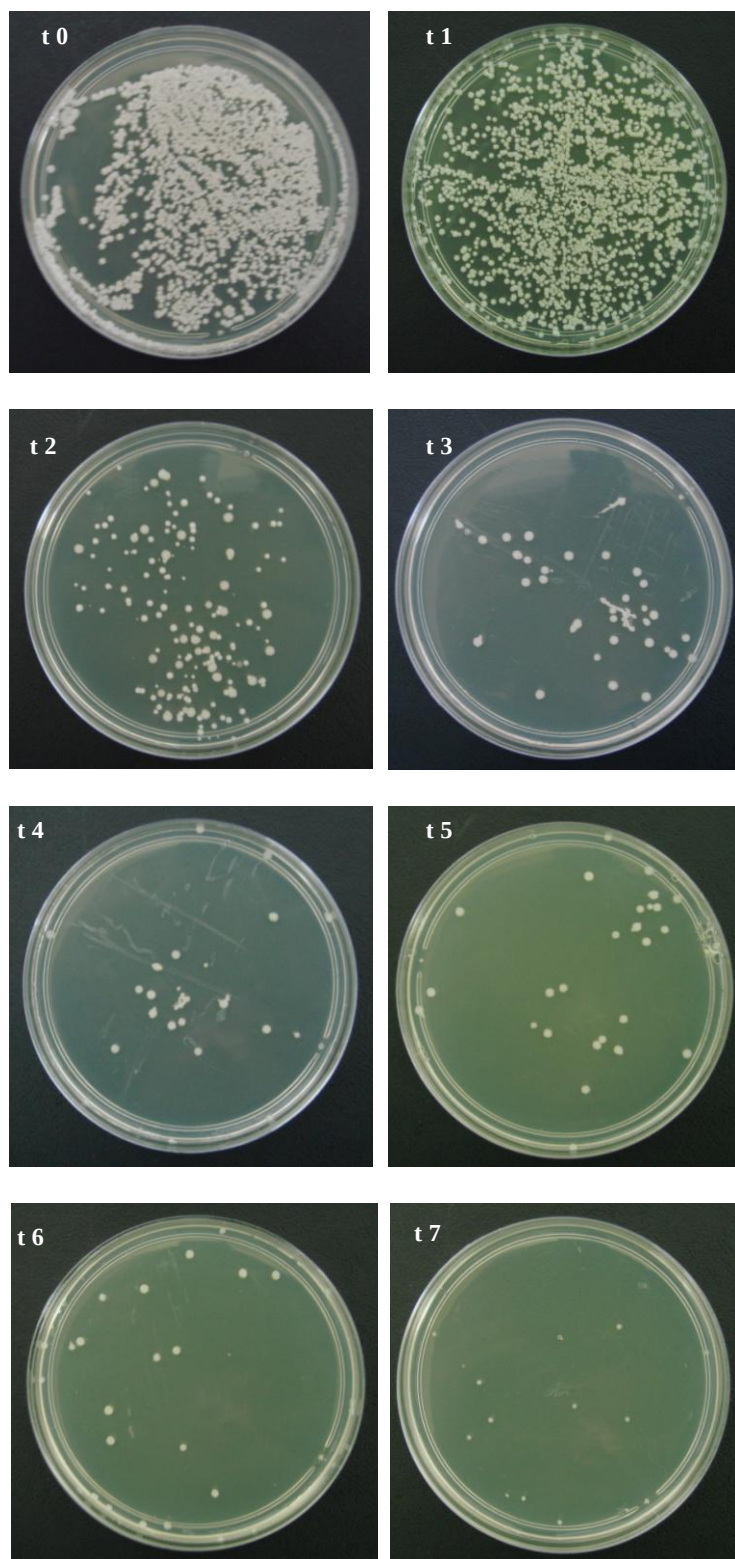


Figura 7 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do O. E. de *C. limon* na concentração de CIMx8 : t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

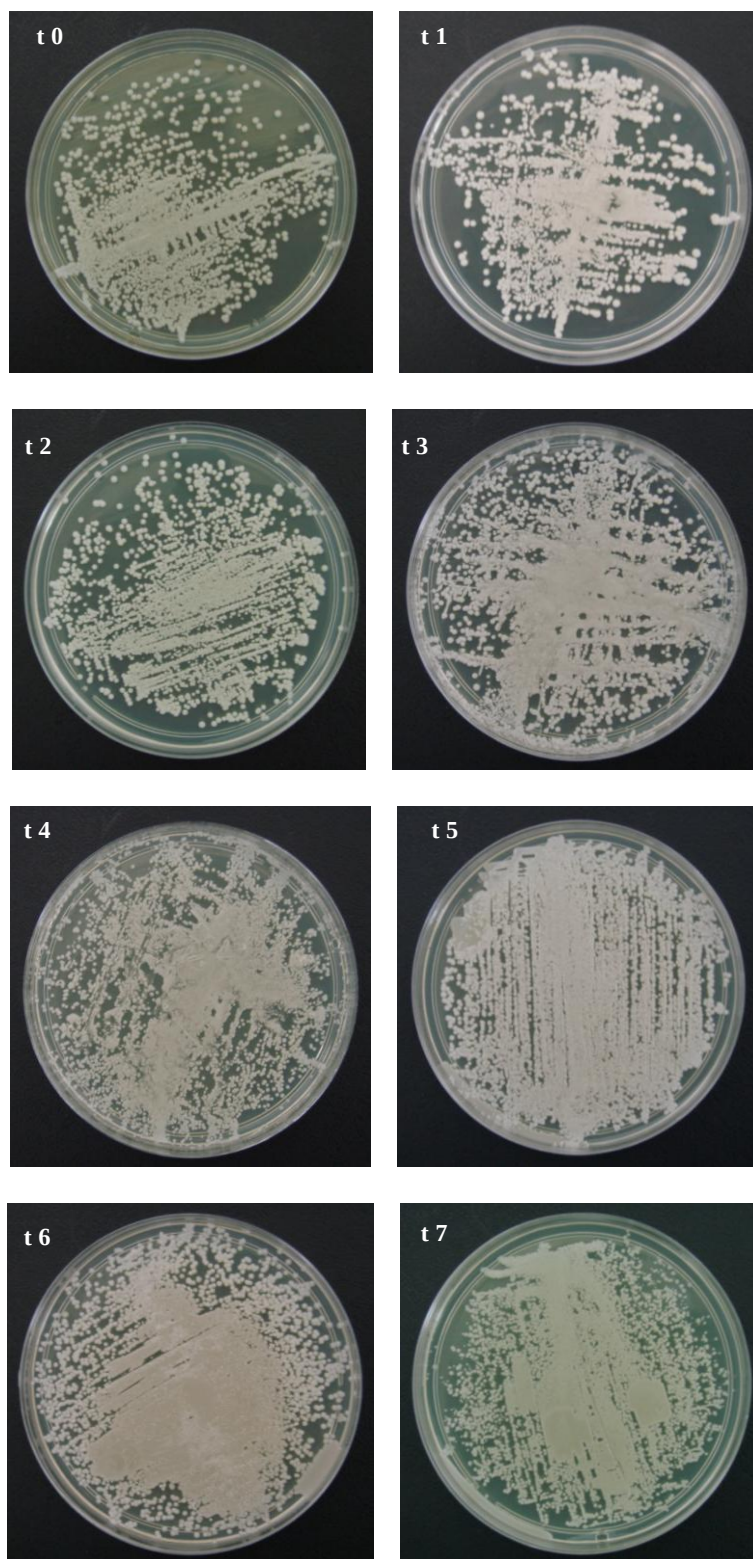


Figura 8 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, sob a ação do miconazol: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

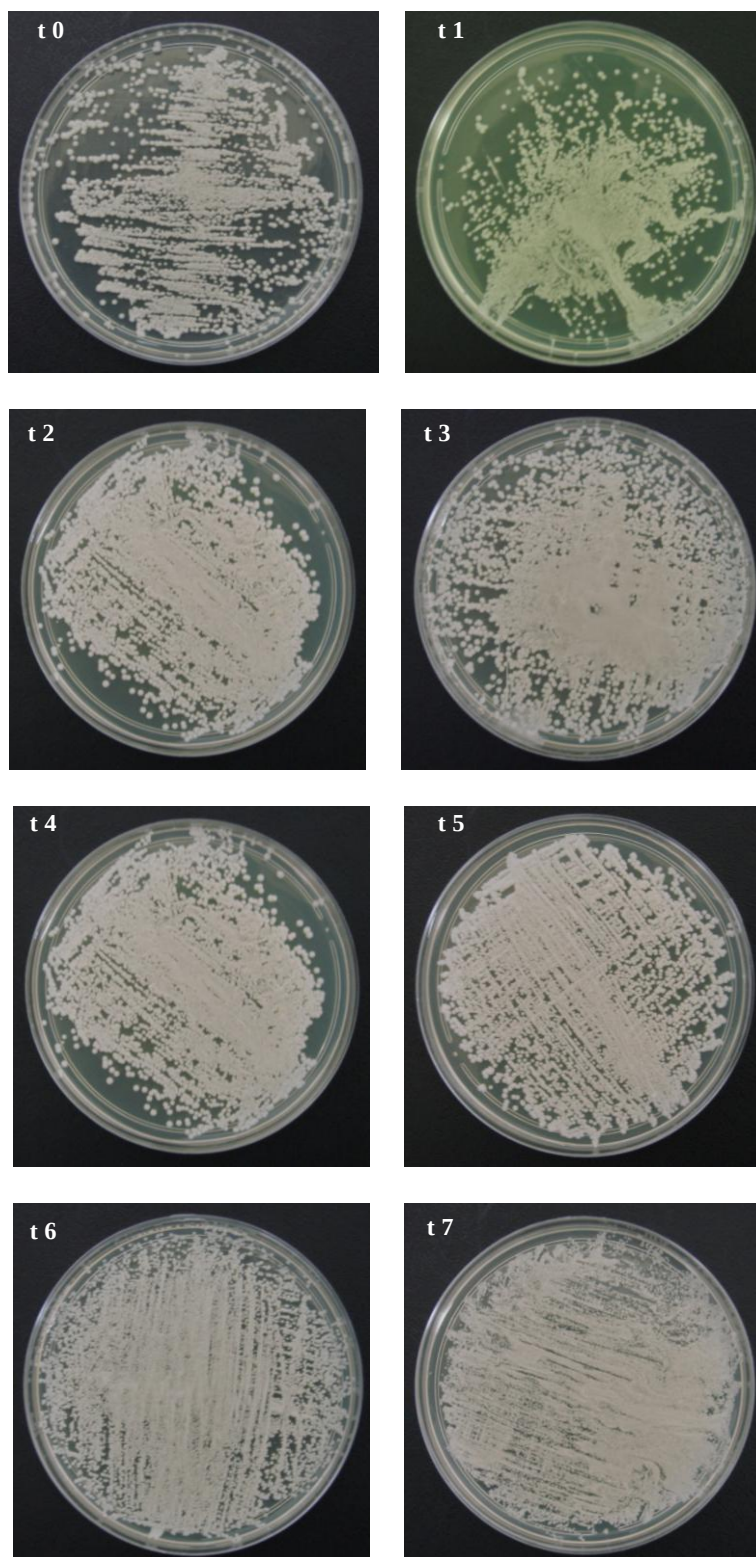


Figura 9 - Ensaio Cinética microbiana – cepa *C. albicans* ICB 12, no experimento controle livre de produtos-teste: t0= 0 horas, t1= 1 horas, t2= 2 horas, t3= 4 horas, t4= 6 horas, t5= 8 horas, t6= 12 horas e t7= 24 horas.

Na avaliação da interferência do produto sobre a morfologia das leveduras do gênero *Candida*, os resultados obtidos foram:

a) *C. albicans*:

a.1) *C. albicans* ICB 12: controle (meio sem produto antifúngico) - foi observado crescimento de blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios hialinos característicos da levedura;

a.2) *C. albicans* ICB 12: controle com miconazol - foi observada a formação de blastoconídios hialinos;

a.3) *C. albicans* ICB 12: teste com o óleo essencial de *C. limon* com CIM de 0,078 µg/mL – observou-se blastoconídios e raras pseudohifas rudimentares e hialinas.

b) *C. tropicalis*:

b.1) *C. tropicalis* ATCC 13803: controle (meio sem produto antifúngico) - foi observado crescimento de blastoconídios e pseudo-hifas hialinas características da levedura;

b.2) *C. tropicalis* ATCC 13803: controle com miconazol - foi observada a formação de blastoconídios e pseudo-hifas rudimentares e hialinas;

b.3) *C. tropicalis* ATCC 13803: teste com o óleo essencial *C. limon* com CIM de 0,312 µg/mL- observou-se blastoconídios e raras pseudohifas rudimentares e hialinas.

c) *C. guilliermondii*:

c.1) *C. guilliermondii* LM 01: controle (meio sem produto antifúngico) - foi observado crescimento de blastoconídios e pseudohifas hialinas características da levedura;

c.2) *C. guilliermondii* LM 01: controle com miconazol - foi observada a formação de blastoconídios hialinos;

c.3) *C. guilliermondii* LM 01: teste com o óleo essencial *C. limon* com CIM de 0,078 µg/mL - observação apenas de blastoconídios hialinos.

d) *C. krusei*:

d.1) *C. krusei* ATCC 6258: controle (meio sem produto antifúngico) – observação de crescimento de blastoconídios e pseudohifas hialinas características da levedura;

d.2) *C. krusei* ATCC 6258: controle com miconazol - foi observada a formação de blastoconídios hialinos;

d.3) *C. krusei* ATCC 6258: teste com o óleo essencial *C. limon* com CIM de 0,078 µg/mL - observou-se apenas blastoconídios hialinos.

Os resultados obtidos revelaram inibição na formação de clamidoconídios em todas as cepas testadas sob a ação do O.E. de *C. limon*, bem como sob a ação do antifúngico sintético miconazol.

Quanto à formação de pseudo-hifas, observou-se inibição das mesmas sob a ação do O.E. testado apenas para as cepas de *C. guilliermondii* e *C. krusei*. Sob a ação do miconazol, verificou-se a não inibição de pseudo-hifas apenas para a cepa *C. tropicalis*.

Em todas as cepas testadas sob a ação dos produtos naturais e sintético, foram verificados blastoconídios (Figura 10).

Os ensaios de controle com crescimento sem adição de produtos teste apresentaram para todas as cepas crescimento fúngico normal, com formação das estruturas morfológicas blastoconídios e pseudo-hifas em todas as cepas testadas, e de clamidoconídios apenas na *C. albicans* (Figura 10). Esses dados confirmam a viabilidade celular das amostras e sua capacidade normal de morfogênese.

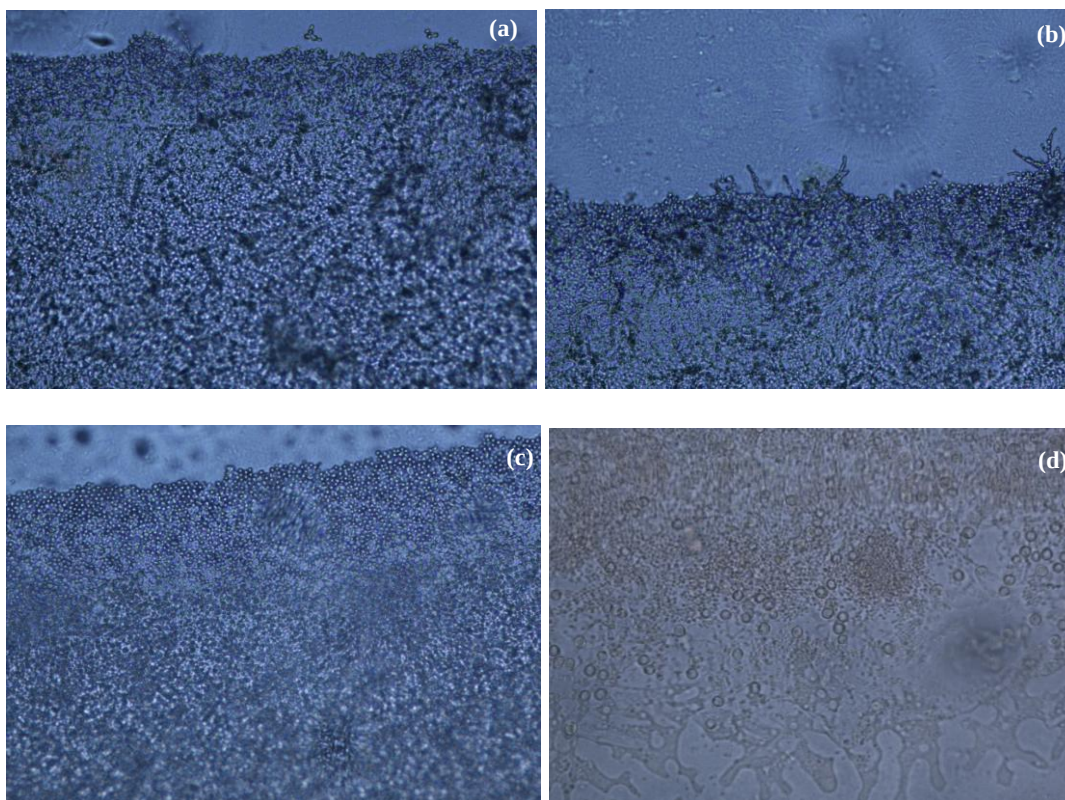


Figura 10 - Aspecto microscópico da cepa *C. albicans* ICB 12: (a, b) sob ação do O. E. de *C. limon*; (c) sob a ação do miconazol; (d) experimento controle.

## 5 DISCUSSÃO

A Fitoterapia vem assumindo uma posição de merecido destaque no contexto científico atual. A análise de estudos empreendidos nos últimos anos permite notar uma mudança acelerada na maneira como os fitomedicamentos têm sido tratados pela literatura científica. O despertar de consciências para a importância latente do emprego de produtos naturais com fins terapêuticos amparado em bases científicas conduziu a uma multiplicação de estudos sobre o tema. Práticas empíricas estão sendo substituídas por protocolos definidos, desenvolvidos a partir de análises criteriosas, levando-se a um conhecimento pormenorizado não só de espécies vegetais isoladas, mas da estrutura complexa de seus constituintes, tais como os óleos essenciais, ácidos orgânicos e vitaminas. Essas informações permitem selecionar as melhores indicações de uso para cada substância, dentro de parâmetros de segurança e eficácia, otimizando suas propriedades e conferindo um *status* de excelência à Fitoterapia, o que não ocorria até há bem pouco tempo.

Dada a escassez de estudos que abordem esta questão no contexto da medicina complementar no Brasil, a comunidade científica se mostra receptiva a trabalhos que abordem o uso racional de fitomedicamentos para o tratamento das diversas patologias existentes. A Portaria nº 3916/98, que aprova a Política Nacional de Medicamentos, estabelece, no âmbito de suas diretrizes para o desenvolvimento científico e tecnológico: deverá ser continuado e expandido o apoio às pesquisas que visem ao aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRASIL, 2006).

Fenner *et al.* (2006) realizou um levantamento sobre as plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica e constatou que os dados publicados sobre este assunto ainda são escassos, com poucas espécies tendo sido investigadas. Uma pesquisa feita por França *et al.* (2008) afirmou que, embora os herbolários participantes do levantamento realizado em seu estudo demonstrassem um bom conhecimento acerca dos princípios ativos das ervas que comercializam, ainda existem lacunas no concernente à indicação terapêutica correta, interações farmacológicas ou intoxicações, o que dificulta a orientação aos usuários. Todos esses fatores evidenciam as dificuldades que se apresentam para a

obtenção de uma padronização do emprego de fitomedicamentos de uma maneira mais racional. Essa constatação serve a estimular o desenvolvimento de pesquisas visando conhecer detalhadamente a intrincada estrutura dos fitomedicamentos, de modo que se possa explorar todas as suas propriedades terapêuticas, sempre se pautando em bases seguras.

De posse desses dados, decidiu-se por realizar esse estudo empregando um fitomedicamento consagrado pelo uso ancestral e respaldado cientificamente – *Citrus limon* – para tratar uma afecção de grande relevância na rotina odontológica: a candidíase.

Mesmo sendo *C. limon* uma planta de uso terapêutico aprovado por organismos regulatórios internacionais, não há relato de ensaios clínicos na literatura, ao mesmo tempo em que há menção a restrições ao seu uso nesse sentido (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

A regulamentação para os testes de avaliação antimicrobiana é de responsabilidade do NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standards*), quer seja para analisar antimicrobianos convencionais, como os antibióticos, como para produtos de origem natural. Entretanto, em se tratando de óleos essenciais, dadas suas propriedades químicas singulares, bem como outras variáveis, como a técnica usada, o meio de cultura e o microorganismo testado, esse protocolo não pode ser seguido à risca. Assim, desde que algumas modificações sejam realizadas, esses métodos podem ser adaptados (NOSTRO *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2005). Outro detalhe a influir diretamente nos resultados é o tempo de incubação. Considerando-se a volatilidade dos óleos essenciais, durante o tempo de incubação pode haver interferência da decomposição ou evaporação sobre os resultados obtidos, sendo importante realizar a leitura com o mesmo intervalo de incubação para todos os microrganismos e repetições (duplicatas), a fim de registrar minimamente esta interferência (JANSSEN *et al.*, 1987; BASIM; BASIM, 2003).

Para fins de estabelecimento da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *in vitro*, as técnicas mais utilizadas são da difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (NOSTRO *et al.*, 2007; HAMMER *et al.*, 2003). Neste estudo, optou-se pela técnica da microdiluição para a determinação da CIM, haja vista apresentar resultados reprodutíveis, além de ser

considerada atualmente a técnica mais largamente empregada na realização do antibiograma quantitativo (HADACECK; GREGER, 2000; JANSSEN *et al.*, 1987). Achados na literatura sugerem que o teste da ação antimicrobiana dos óleos essenciais seja realizado com isolados múltiplos para cada espécie testada (HAMMER *et al.*, 2003). Portanto, foram selecionadas para este estudo, pelo menos, 3 cepas por espécie.

Buscando-se graduar o potencial antimicrobiano de produtos vegetais, Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma escala, a partir de resultados obtidos de concentrações inibitórias mínimas obtidas através da técnica de microdiluição. A mesma determina que produtos cuja CIM seja de até 0,5 µg/mL possuem forte poder antimicrobiano. Aqueles cujas CIMs se situem entre 0,6 e 1,5 µg/mL são munidos de moderado poder antimicrobiano. Já aqueles produtos com valores de CIM acima de 1,6 µg/mL são tidos como de fraco poder antimicrobiano.

Considerando-se que esse estudo encontrou para o O.E. de *C. limon* uma CIM contida entre 0,078 e 0,156 µg/mL, e adotando-se a escala de gradação de Aligianis *et al.* (2001), pode-se afirmar que este óleo essencial apresenta forte poder antimicrobiano. Esses resultados endossam vários estudos precedentes, que atribuíam propriedades antifúngicas remarcáveis a *C. limon* (ARAÚJO, 2005; FENNER, 2006; LIMA *et al.*, 2006; REZENDE; COCCO, 2002; FRANÇA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2007b).

Tampieri *et al.* (2005) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *C. limon* sobre cepas de *C. albicans*, usando um método de susceptibilidade antifúngica em meio Agar semi-sólido. O resultado das CIMs obtidas foi igual ao fim de 48 horas e após 7 dias (5000 ppm), evidenciando sua boa atividade antimicrobiana.

Ezzat (2001) realizou testes com 4 óleos essenciais (*Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita* L., *Eucalyptus occidentalis* e *Citrus limon* L.) e um extrato (*Thuja orientalis* L.), todos provenientes de plantas adotadas pelo uso popular como antimicrobianos, visando avaliar sua eficácia antifúngica contra espécies de *C. albicans*. O método utilizado para observar a atividade biológica dessas plantas foi o de difusão em ágar, concluindo-se que *C. limon* exibiu o maior halo de inibição dentre as espécies testadas (3,7mm).

Lima *et al.* (2006) observou em seu estudo com óleos essenciais contra espécies do gênero *Candida* que, de um modo geral, a *C. tropicalis* mostrou-se como a espécie mais resistente à ação do O.E. de *C. limon*, fato este também observado em nosso estudo. Embora a resistência desta levedura a diversos antifúngicos venha sendo mencionada na literatura, as características deste mecanismo não são bem definidas. A ocorrência desta resistência pode ser atribuída a fatores como diminuição do ergosterol presente na membrana celular ou mutação em genes específicos, embora não exista um consenso quanto a isto (MENEZES; MENDES; CUNHA, 2005; HOCHENFELLNER *et al*, 2000).

Além das propriedades de inibição sobre o gênero *Candida*, o O.E. de *C. limon* já demonstrou grande eficácia contra diversos espécimes microbianos. No trabalho de Sá *et al.* (1996) foi realizado um screening com óleos essenciais de plantas utilizadas como fitomedicamentos em uma comunidade da cidade de João Pessoa-PB, e nele é relatada a ação eficaz do óleo de *C. limon* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Souza *et al.* (2005) encontraram que o óleo essencial de *C. limon* apresentou atividade inibitória sobre alguns tipos de fungos filamentosos, como *A. flavus*, *Rizophus* spp. and *A. niger*, com halos de inibição de 13, 12 e 10mm, respectivamente.

O estudo da interferência do óleo essencial testado sobre a viabilidade das cepas fúngicas foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Neste ensaio registrou-se a diminuição do número de células viáveis em função do tempo. Como uma colônia normalmente é originada a partir de um organismo, o total de colônias que se desenvolvem no meio corresponde ao número de células viáveis presentes na alíquota analisada. Neste estudo observou-se atividade fungicida do O. E. relacionada ao tempo de exposição.

Os resultados dessa pesquisa demonstraram que, na cinética de morte da cepa *C. tropicallis* ATCC 13803, o óleo essencial de *C. limon* apresentou propriedade fungicida satisfatória, com o seu tempo de morte muito inferior ao do produto sintético miconazol. Isto nos leva a crer que o produto natural testado diminui a fase de latência, que é o tempo necessário ao ajuste dos microrganismos ao novo ambiente físico-químico, inviabilizando a recuperação e resistência do mesmo. Com relação à fase estacionária do crescimento microbiano, a qual consiste na manutenção da velocidade de crescimento e maior resistência da cepa ao agente

químico, esta foi observada para a concentração de CIM/2 do produto natural, após tempo de 12 horas. Observaram-se os mesmos resultados para o miconazol. Nas demais concentrações do óleo essencial, observa-se ausência da fase estacionária. A presença de acentuada fase de morte representa a inibição do crescimento, em especial para as concentrações de CIMx8 e CIMx4, na qual o número de células viáveis decresce logaritmicamente. Esta última condição ocorre devido às condições desfavoráveis proporcionadas pelo sistema à sobrevivência do microrganismo.

No concernente à característica da cinética de morte microbiana da cepa *C. albicans* ICB 12, verificou-se tempo de morte muito inferior ao do produto sintético Miconazol, em todas as concentrações testadas do O. E. de *C. limon*. Há encurtamento da fase de latência e ausência da fase estacionária, em comparação ao antifúngico sintético. O satisfatório efeito fungicida é caracterizado pela acentuada fase de morte, com intervalo de tempo de 2 horas (para a concentração de CIMx8) a 12 horas (para as concentrações de CIM e CIM/2).

O controle de crescimento sem acréscimo do produto teste apresentou curva de crescimento característica, reafirmando a viabilidade das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* envolvidas neste ensaio. Os resultados contemplados nesta pesquisa vêm confirmar as afirmações de Rana *et al.* (1997) de que o estudo dinâmico do tempo de morte microbiana permite observar a complexa natureza da ação inibitória do óleo essencial.

Um estudo datado de 1987 alertava para a impossibilidade para se traçar um comparativo entre resultados de diversos autores sobre a análise cinética de leveduras frente à ação de produtos naturais devido à escassez de estudos com esta abordagem metodológica ou com diferenças no que diz respeito ao microrganismo, concentração do produto teste ou tipo de antifúngico usado. Todos estes fatores inviabilizam uma análise comparativa (JANSSEN *et al.*, 1987).

Estudos recentes têm demonstrado que a mudança morfológica está associada com a patogenicidade do microrganismo, e acredita-se que os fatores ambientais possam alterar o estado fisiológico da levedura comensal, induzindo a alterações morfogenéticas que resultam na formação de micélio, o qual se associa com a evolução dos estados patológicos (LEBERER *et al.*, 1997; ROMANI *et al.*, 2003). Essas mudanças representam características significantes, com implicações na patogênese e no diagnóstico das infecções causadas por leveduras, e ocorrem

tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nos testes *in vitro*, o blastoporo ou levedura pode ser obtido a partir de seu crescimento em meios de cultura sólido ou líquido, enquanto que na forma micelial ou de pseudo-micélio, bem como de clamidoconídio, é influenciada por vários fatores ambientais, tais como alterações na composição de meios, adição de soro, crescimento sob condições semi-anaeróbicas ou baixa-tensão de CO<sub>2</sub>, pH baixo, dentre outros. O dimorfismo em *Candida* spp. (levedura e micélio) também foi observado em infecções ativas, com predominância da forma blastospórica (levedura) em indivíduos sadios portadores. De modo geral, a forma micelial encontra-se associada com a invasão do fungo, ao passo que as leveduras estão associadas com a colonização inicial. Desta forma, a capacidade de morfogênese contribui para o aumento do potencial patogênico do fungo, uma vez que a forma micelial apresenta maior resistência à fagocitose que as leveduras (LO *et al.*, 1997; ROMANI *et al.*, 2003). Em vista disto, como critério de identificação de *C. albicans* são utilizados testes de formação de tubo germinativo e clamidoconídios, que são caracterizados como estruturas de resistência formadas por uma parede celular grossa e citoplasma condensado. (LACAZ *et al.*, 2002).

Na realização deste presente estudo foram observadas alterações no padrão morfológico de todas as cepas de *Candida* submetidas ao ensaio, especialmente no que diz respeito àquelas pertencentes à espécie *C. albicans*. Em geral, a totalidade das cepas demonstrou comportamento semelhante, tanto diante da ação do óleo essencial de *C. limon*, como diante do miconazol.

Sob ação do O. E., houve inibição na formação de pseudo-hifas nas cepas *C. guilliermondii* LM 01 e *C. krusei* ATCC 6258. Com relação às cepas de *C. albicans* ICB 12, a formação de clamidoconídios também foi inibida pela presença do O. E. do produto natural testado. Em contrapartida, o miconazol só não inibiu a formação de pseudo-hifas no caso da cepa de *C. tropicalis*.

No experimento controle, verificaram-se as características morfológicas inerentes a cada espécie, comprovando, desta forma, a viabilidade celular e a capacidade normal de morfogênese das mesmas.

À medida que se aprofundam os estudos envolvendo fitomedicamentos, fica patente a complexidade estrutural exibida por esses compostos. Se por um lado, temos substâncias com grandes possibilidades de aplicação a serem pesquisadas, o pouco conhecimento acerca de suas propriedades evidencia que o uso atual se

pauta, em grande parte, pelo empirismo. Não há critérios rígidos no tocante à posologia e doses tóxicas ou letais de fitoterápicos para o tratamento de alguma doença, fazendo com que o uso aleatório desses princípios possa ser realizado sem qualquer controle. Uma regulamentação nesse sentido mostra-se de extrema importância, uma vez que essas drogas representam uma alternativa economicamente mais viável às populações desfavorecidas, além de representarem um resgate histórico do conhecimento nativo. Fica clara a necessidade de estudos sérios na área, reafirmando, assim, a credibilidade do emprego de plantas medicinais no meio médico-odontológico, evidenciando sua essência científica.

Na Odontologia, o uso terapêutico de *Citrus limon* Linn. pode-se mostrar de grande valia, tendo-se em conta suas diversas ações – antisséptica, antimicrobiana, antiinflamatória - motivando ainda mais as pesquisas a seu respeito, a fim de instituir um protocolo de uso seguro.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de atividade antifúngica do óleo essencial de *C. limon*, conclui-se que:

- As concentrações inibitórias mínimas para mais de 80% das cepas envolvidas no ensaio submetidas à ação do óleo essencial de *C. limon* demonstraram-se bons indicadores de atividade fungistática e fungicida do óleo estudado;
- O óleo essencial de *C. limon* apresentou efetiva capacidade de inibição sobre o crescimento de todas as cepas de *Candida* ensaiadas, além de demonstrar grande propriedade fungicida quando em baixas concentrações;
- O óleo essencial de *C. limon* demonstrou bom poder de inibição do crescimento das cepas submetidas aos ensaios, inclusive com desempenho superior ao do produto sintético miconazol no estudo da interferência na cinética de crescimento das leveduras;
- O óleo essencial testado promoveu alterações na morfogênese de leveduras do gênero *Candida*, com inibição na formação de estruturas morfológicas com potencial patogênico, resultado esse semelhante ao que se observou com relação ao miconazol, antifúngico sintético usado como controle.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOUE, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALLEGRI, J.; BOUCHBERG, M. S. ; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et applications in microbiologia. **Soc. Pharm. Montpellier**, v. 33, n. 1, p. 73- 86, 1973.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993.

ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Fungal infections of the mouth. **Braz J Oral Sci.**,v.1, n.1, p.19-26, 2002.

ARAÚJO, C. R. F. “Estudo da ação antimicrobiana e antifúngica do extrato do *Citrus limon* Linn. (limão) e do *Anacardium occidentale* Linn. (cajuero) sobre microorganismos do biofilme dental e leveduras do gênero *Candida*”. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal). Universidade Federal da Paraíba, p.43-45 p. 85-91, 2005.

ARAÚJO, C. R. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S. Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anacardium occidentale* Linn. sobre levedura do gênero *Candida*. **Arquivos em Odontologia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 3, p. 193-272, 2005.

ARIAS, B. A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 89-95, 2005.

ARRUDA, I. G. “Plantas medicinais do Brasil com atividade antifúngica”. Monografia (Especialização em Microbiologia e Micologia). Universidade Federal da Paraíba, 2006.

BASIM, E.; BASIM, H. Antibacterial activity of *Rosa damascene* essential oil. **Fitoterapia**, v. 74, p. 394-396, 2003.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Rev. Odontol.** Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 13, n. 4, 1999.

BAUER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 3, p. 493-496, 1966.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 3 de Maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 mar. 2006.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, 2008.

BONFIM, I. P. R.; SOARES, D. G.; TAVARES, G. R.; SANTOS, R. C.; ARAUJO, T. P.; PADILHA, W. W. N. Prevalência de lesões de mucosa bucal em pacientes portadores de prótese dentária. **Pesqui. Bras. Odontopediatria Clín. Integr.**, v. 8, n. 1, 117-121, 2008.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro de Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 4, 2006.

BRIAN, C.; MUZYKA, D.M.D.; GLICK, M.. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. **JADA**, v. 126, p. 63-72, 1995.

BUDTZ-JORGENSEN, E. etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol.Scand.**, v.48, p. 61-69, 1990.

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

CEDRO, I.R. Estudo clínico comparativo do efeito cicatrizante da *Spondias mombin* jaq. e de *Citrus limonum* O. em herpes simples recorrente. In: **Encontro de Iniciação Científica e Mostra de Produção Científica da UEPB**, 9, 2002, Campina Grande. Anais..., 9, Campina Grande: UEPB, p. 80, 2002.

CHIRINOS, F.A.; QUIÑÓNEZ, B. ; PRADO, J. ; FLORIDO, R. Enfermedades periodontales asociadas a la del vírus de inmunodeficiência adquirida, reporte de lesiones orales y corporales. **Rev. ADM**, v. 65, n. 6, p. 322-326, 2008.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infection. In: Lorian, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Williams e Wilkins, p. 739-787, 1991.

COLOMBO, A. L.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D. A.; RINALDI, M. G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 535-540, 1995.

CRAVEIRO, A. A. *et al.*. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UJC, 1981.

DEL RIO, J.A.; FUSTER, M.D.; GÓMEZ, P. PORRAS, I.; GARCÍA-LINDÓN, A. ORTUNO, A. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 457-461, 2004.

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

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.

ERNST, M. E.; KLEPSE, M. E.; WOLF, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* spp. **Diag Microbiol Infect Dis** v. 26, p. 125-131, 1996.

EZZAT, S.M. *In vitro* inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.757-59, 2001.

FARIAS, N. M. P.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle da infecção hospitalar. **XVI Prêmio Jovem Cientista**. Edição: Saúde da população, controle da infecção hospitalar. Porto Alegre, 2000.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 42, n. 3, 2006.

FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. Comparison of different isolation methods of essential oils from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave "dry" distillation. **Flavour Fragr. J.**, v.22, p.494-504, 2007.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, v.61, n.2, p.201-208, 2008.

GRABE, D. F. **Manual de teste de tetrazólio**. Brasília: AGIPLAN, 1976.

GREENBERG, M. S.; GLICK, M.; SHIP, J. A. **Burket's Oral Medicine**. 11<sup>th</sup> ed., p. 77-84, BC Decker Inc., 2008.

GUNGI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Screening of antifungal according to activities inducing morphological abnormalities. **Agric. Biol. Chem.**, v. 47, n.9, p. 2061-2069, **1983**.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem. Analysis**, n. 11, p. 137-147, 2000.

HAMMER, K. A.; DRY, L.; JOHNSON, M.; MICHALAK, E. M.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. **Oral Microbiol Immunol.** V. 18, p. 389-392, 2003.

HANNULA, J.; SAARELA, M.; JOSIMIES-SOMER, H. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal species and stability of colonization in young children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.14, p.176-182, 2000.

HOCHENFELLNER, F.; SORIA, M.; CORDOBA, S.; VIVOT, W.; RODERO, L.; DAVEL, G. **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n.40, p.361, set-2000.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R. ; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C., STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta Med.** v. 53, p. 395-398, 1987.

JOHANN, S. "Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos". Dissertação (Mestrado). UFSC, Florianópolis, 2003.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, V. L.; PIZZOLATTI, M. G.; SCHRIPSEMA, J. BRÁZ-FILHO, R.; BRANCO, A.; JÚNIOR, A. S. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 681-685, 2007.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**, 2. ed., São Paulo: Livraria Editora Santos, 1998.

JORGE, A. O. C.; KOGA-ITO, C. Y.; GONÇALVES, C. R.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, C. S. Presence of *candida* genus yeasts in the saliva of patients with different predisposing factors and of control individuals. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 11, n. 4, p. 279-285, 1997.

KEELE, D. J.; DELALLO, V. C.; LEWIS, R. E.; ERNST, E. J.; KLEPSE, M. E. Evaluation of anphoterin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-killing methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p. 121-126, 2001.

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E. ERNST, M.E.;PFALLER, M.A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n.5, p. 1207-1212, 1998.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4th ed., Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1998.

LACAZ, C. L.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARL, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Medica**, 9. ed.,1104p., São Paulo: Sarvier, 2002.

LEBERER, E.; ZIEGELBAUER, K.; SCHMIDT, A.; HARCUS, D.; DIGNARD, D.; ASH, J.; JOHNSON, L.; THOMAS, D. Y. Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the ste20p-like protein kinase CaCl4p. **Curr Biol**, v. 7, p. 539-546, 1997.

LIMA, E. O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A. Preliminary evaluation of antifungal activity of Xanthoxyline. **Acta Farm. Bonaerense**, v.14, n.3, p. 213-216, 1995.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R, A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LO, H. J.; KOHLER, J. R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A.; FINK, G. R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, p. 939-949, 1997.

LOTA, M-L; SERRA, D. DE R.; TOMI, F.; JACQUEMOND, C.; CASANOVA, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **J. Agric. Food Chem**, v.50, p. 796-805, 2002. PENIDO, A. B., SILVA, M. W. B. **Guia Fitoterápico**, Facimp, p. 11-14, p. 59-65, 2007.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Hortic. Bras**, v. 19, n. 1, 2001.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Hortic. Bras.**, v. 19, n. 1, 2001.

MALTA JÚNIOR, A.; SOUSA E SILVA, J.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. **Plantas medicinais usadas na Odontologia**. Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Farmácia, p.11-44, 1999.

MATOS, F. J. M. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

MELO, N. M. C.; SAMPAIO, M. C. C.; SOARES, M. S. M.; OLIVEIRA, N. M. C.; CAVALCANTI, M. S. L. Estomatite protética: correlação clínico-micológica. **Rev. Fac. Odontol. Univ. Fed. Bahia**, v. 19, p. 11-15, 1999.

MESQUITA, R. A.; AGUIAR, M. C. F.; TARQUINO, S. B. C. Candidíase oral e a infecção HIV. **Rev. CRO-MG**, v. 4, n. 1, p. 27-31, 1998.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.3, p. 354-355, 2005.

MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; BATHALA, M. S.; WU, N. W.; BEAL, J. L.; WHITE, R. Antimicrobial agents from higher plants. I: Introduction, Rationale and Methodology. **Llajdia**, v. 35, n. 2, p.157-166, 1972.

MOREIRA, A. C.; FALCÃO, A. F. P.; ENCARNAÇÃO, M. L.; LIMA, T. L.; SANTOS, F. Q.; LIMA, B. B. Estudo clínico e microbiológico de candidoses bucais. **Rev. Fac. Odontol. Univ. Fed. Bahia**, v. 23, p. 54-58, 2001.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; RODRIGUES, J. A. O.; BORIOLO, M. F. G.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J. F. Biótipos de *Cândida* spp. Na cavidade oral de escolares de diferentes categorias socioeconômicas de Piracicaba-SP, Brasil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.3, p.187-195, 2001.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Reference method for roth diluition antifungal susceptibility testing of yeasts. Villanova, **PA NCCLS Approved Standard M27-A**, v.17, n. 9, 1997.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Med Microbiol**. V. 56, p. 519-523, 2007.

OLIVEIRA, R. S.; COLAÇO, W. COULAUD-CUNHA, S. CASTILHO, S. R. Revisão sistemática em fitoterapia: padronização internacional de qualidade. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.2, p.271-274, 2007a.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 3, 2007b.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A. FURLONG, E. B. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alim. Nutr.**, v.18, n.3, p.267-275, 2007c.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X. da; PAULA, C. R. de. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, whit and whitout denture stomatitis. **Pesq Odont Bras**, v. 14, n. 2, p. 119-122, 2000.

PENIDO, A. B., SILVA, M. W. B. **Guia Fitoterápico**, Facimp, p. 11-14, p. 59-65, 2007.

PEREIRA, A. A. “Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos”. Dissertação (Mestrado). UFLA, 2006.

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essencial oil isolated from leaves of aegle marmelos. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, p. 29-34, 1997.

RASOOLI, I.; MIRMOSTAFA, S. A. Antibacterial properties of *Thimus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oil. **Fitoterapia**, v. 73, p. 244-250, 2002.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 36, n. 3, São Paulo, set. 2002.

RIBEIRO, A. Q., LEITE, J. P. V., DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

ROMANI, L.; BITONI, F.; PUCETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, p. 338-343, 2003.

SÁ, L. D.; PAULO, M. Q.; LIMA, E.O.; XAVIER FILHO, L. Activité antimicrobienne d'huilles essentielles sur les bacteries qui causent la conjunctivite. **Separata do boletim da sociedade Broteriana**, v. 67, p. 99-103, 2ª série, 1995 -1996.

SALYERS, A.; WITT, D. Virulence factors that promote colonization. **ASM Press**, p. 30-46, 1994.

SAMARANAYAKE, L. P.; LEUNG, W. K.; JIN, L. Oral mucosal fungal infections. **Periodontology 2000**, v. 49, p. 39-59, 2009.

SANDHU, D. S.; HEINRICH, M. The use of health foods, spices and other botanicals in the Sikh community in London. **Phytotherapy Res.**, v.19, p.633-642, 2005.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby; Grimes. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, 2007.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; BATISTA, F.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Variação sazonal dos teores de taninos em cascas de espécies de barbatimão. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, 2006.

SCALERCIO, M.; VALENTE, T.; ISRAEL, M. S.; RAMOS, M. E. Estomatite protética x candidíase: diagnóstico e tratamento. **RGO**, v. 55, n. 4, p. 395-398, 2007.

SELLAR, W. **Óleos que curam: o poder da aromaterapia**. Rio de Janeiro: Record/ Nova Era, 2002.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da**

**micologia médica**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SILVA, E. P. **A saúde e a cura pela natureza**, 2. ed., João Pessoa: União, 2002.

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.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e aos fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2006.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, n. 2, p. 245-250, 2005.

\_\_\_\_\_. Sensibilidade de fungos filamentosos isolados de alimentos frente a extratos vegetais. **Hig. Aliment.**, v.18, n.124, p.89-91, 2004.

SOUZA, T. M. ; MOREIRA, R. R. D. ; PIETRO, R. C. R. L. ; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade antisséptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.1, n.1, 2007.

SVETAZ, L.; AGUERO, M. B.; ALVAREZ, S.; LUNA, L.; FERESIN, G.; DERITA, M.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S. Antifungal Activity of *Zuccagnia punctata* cav.: Evidence for the Mechanism of Action. **Planta Med.**, Nova York, n. 73, p. 1-7, 2007.

TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; FALCIONI, L.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, p. 339-345, 2005.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm.** v. 15, n.1, p.115-121, 2006.

TRAJANO, V. N. "Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias sobre microorganismos contaminantes de queijo de coalho". Dissertação (Mestrado). UFPB / CT, p.39-41, 2008.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto alegre, Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 361-372, 2005.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia**: manual de plantas medicinais (a farmácia de Deus), 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 165, 1992.

WRIGHT, S.C.; MAREE, J.E.; SIBANYONI, M. Treatment of oral thrush in HIV / AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet. **Phytomedicine**, v. 16, p. 118-124, 2009.