



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos

VANESSA MARIA DE CAMPOS RASTEIRO

EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
***Cymbopogon citratus* E *Melaleuca alternifolia* SOBRE**
Candida albicans* - ESTUDO *in vitro* E *in vivo



2011

VANESSA MARIA DE CAMPOS RASTEIRO

**EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Cymbopogon citratus E *Melaleuca alternifolia* SOBRE
Candida albicans - ESTUDO *in vitro* E *in vivo***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia/Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira.

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para Normalização de Trabalhos acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos:FOSJC/UNESP; 2010.

C157e Rasteiro, Vanessa Maria de Campos
Efeito dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans* estudo in vitro e in vivo / Vanessa Maria de Campos. - São José dos Campos : [s.n.], 2011.
98 .f. : il

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2011
Orientador: Profª Juliana Campos Junqueira

1. *Candida albicans*. 2. Candidose experimental. 3. Camundongos imunossuprimidos. 4. *Melaleuca alternifolia*. 5. *Cymbopogon citratus*. I. Junqueira, Juliana Campos. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 19 de Setembro de 2011 .

Assinatura :

E-mail: vanessam.campos@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

São José dos Campos, 28 de julho de 2011

DEDICATÓRIA

À Deus, por todas as bênçãos, por ter sido sempre tão bom e me fazer enxergar que sempre há um caminho para superar os problemas.

À minha mãe Lourdes e aos meus tios Maria José e Osmar, pelo carinho, educação e ensinamentos, que serão para toda a vida.

Ao meu esposo Rúrik pelo apoio, companheirismo e compreensão, meu porto seguro e minha luz.

Ao meu irmão Rafael e minha prima Priscila, por serem pessoas únicas e especiais em minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, minha orientadora, sempre tão atenciosa, pela confiança depositada, por toda paciência e ensinamento transmitido com tanto carinho, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por todo apoio, sugestão e participação neste trabalho, e minha admiração por ser tão competente e por toda sua vasta sabedoria, que nos é passada com muita competência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do diretor Prof. Adj. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na coordenação da Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga e vice-coordenação do Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa, sempre atenciosos quando solicitados.

Aos demais professores do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pelo convívio durante a realização dos créditos, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Ao Prof. Antonio Lelis Pinheiro da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração com os óleos essenciais.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pessoas importantes para realização deste trabalho.

Aos técnicos do biotério, Marco Antonio Correa Alfredo e Antonio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcellos, por toda paciência e ajuda prestada.

À técnica Maria Salete Faria, por toda ajuda na parte de preparo das lâminas.

Às secretárias da Seção da Pós Graduação pela disponibilidade de sempre em nos atender e à todos os funcionários da biblioteca pelo apoio prestado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste projeto (processo 2010/19117-7).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

À companheira Anna Carolina Borges Pereira da Costa, não tenho nem palavras para agradecer toda ajuda, apoio, sem você não teria como realizar este trabalho.

Aos amigos de laboratório Cristiane Aparecida Pereira, Ana Karina da Silva Machado, Jonata Oliveira, Polyana Figueiredo Vilela, Simone Furgeri Godinho Vilela, Guilherme Teodoro, Marta Majewski e Micheli Penelupi.

Aos alunos de iniciação científica Cássia Fernandes Araujo, Emily Hashimoto, Rodnei Dennis Rossoni e Júnia.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer. "

Amyr Klink

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 <i>Candida albicans</i>	18
2.2 Formação de biofilme por <i>C. albicans</i>	22
2.3 Candidose bucal experimental.....	25
2.4 Óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i>	30
3 OBJETIVOS.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Princípios éticos.....	38
4.2 Preparo dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i>	38
4.3 Efeitos antimicrobianos de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>Candida albicans</i> - Estudo <i>in vitro</i>	39
4.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de <i>C. citratus</i> e <i>M. alternifolia</i> em cultura planctônica de <i>C. albicans</i>	39
4.3.2 Efeitos de <i>C. citratus</i> e <i>M. alternifolia</i> sobre o biofilme de <i>C. albicans</i>	41
4.3.2.1 Formação de biofilme de <i>C. albicans</i> e aplicação dos óleos essenciais.....	41
4.3.2.2 Análise do biofilme por contagem de UFC/mL.....	42
4.3.2.3 Análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura.....	43

4.4 Efeitos antimicrobianos de <i>C. citratus</i> e <i>M. alternifolia</i> sobre <i>C. albicans</i> - Estudo <i>in vivo</i>	44
4.4.1 Animais experimentais.....	44
4.4.2 Verificação da colonização natural por <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal dos camundongos.....	44
4.4.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina.....	45
4.4.4 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i>	46
4.4.5 Inoculação da suspensão de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal dos camundongos.....	46
4.4.6 Aplicação do óleo essencial.....	47
4.4.7 Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal dos camundongos.....	48
4.4.8 Eutanásia dos animais.....	48
4.4.9 Análise macroscópica de <i>C. albicans</i> no dorso da língua dos camundongos.....	48
4.4.10 Análise microscópica de <i>C. albicans</i> no dorso da língua dos camundongos.....	48
4.4.11 Microscopia eletrônica de varredura da língua dos camundongos.....	49
4.5 Análise Estatística	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Concentração Inibitória Mínima de <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Cymbopogon citratus</i> em culturas planctônicas de <i>Candida albicans</i>	52
5.2 Efeitos de <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Cymbopogon citratus</i> sobre biofilme de <i>Candida albicans</i>	51
5.2.1 Análise do biofilme por contagem de UFC/mL.....	52
5.2.2 Análise do biofilme por MEV.....	53
5.3 Recuperação de <i>Candida albicans</i> da cavidade bucal dos camundongos.....	54

5.4 Análise macroscópica do dorso da língua dos camundongos.....	57
5.5 Análise microscópica do dorso da língua dos camundongos.....	58
5.6 MEV da língua dos camundongos.....	67
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÃO.....	79
8 REFÊRENCIAS.....	80
ANEXO A.....	94

Rasteiro VMC. Efeitos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans* - estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans*. No estudo *in vitro* foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *M. alternifolia* e *C. citratus* em culturas planctônicas de *C. albicans* de acordo com as normas da NCCLS. Os efeitos dos óleos essenciais também foram testados sobre biofilmes de *C. albicans* formados no fundo da placa de 96 poços por 48 horas. Para a realização do estudo *in vivo*, foram utilizados 42 camundongos imunossuprimidos por injeções de prednisolona. A indução de candidose experimental foi realizada por inoculações de *C. albicans* (10^8 células/mL) no dorso da língua dos animais e administração de tetraciclina na água de beber. A seguir, os camundongos foram tratados com 3 aplicações do óleo essencial de *C. citratus*, *M. alternifolia* ou solução fisiológica (grupo Controle) no dorso da língua. Foram realizadas coletas de amostras bucais, antes e após o tratamento, para recuperação de leveduras da cavidade bucal dos animais e contagem de UFC/mL. Após 5 dias da indução da candidose experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para análise histológica e de microscopia eletrônica do dorso da língua. Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes de Tukey e Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Os resultados obtidos nos testes realizados *in vitro* demonstraram que a CIM foi de 0,195% para *M. alternifolia* e menor que 0,01% para *C. citratus*. A redução microbiana observada nos biofilmes de *C. albicans* foi de 6,88 e 5,84 log, respectivamente, para *M. alternifolia* e *C. citratus*. Em relação à recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos animais, verificou-se redução microbiana de 6,49 log para *M. alternifolia* e 5,95 log para *C. citratus*. Na análise microscópica do dorso da língua, observou-se colonização de leveduras e hifas em todos os grupos experimentais, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Entretanto, verificou-se que o grupo tratado com *M. alternifolia* apresentou menor quantidade de lesões epiteliais em relação ao grupo tratado com *C. citratus* e controle. Concluiu-se que os óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* sobre *C. albicans*.

Palavras chave: *Candida albicans*. Candidose experimental. Camundongos imunossuprimidos. *Melaleuca alternifolia*. *Cymbopogon citratus*.

Rasteiro VMC. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Melaleuca alternifolia* on *Candida albicans* - study in vitro and in vivo [dissertation] São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity in vitro and in vivo of essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Melaleuca alternifolia* on *Candida albicans*. In vitro study was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of *M. alternifolia* and *C. citratus* in planktonic cultures of *C. albicans* according to NCCLS standards. The effects of essential oils were also tested on biofilms of *C. albicans* formed deep inside the 96-well plate for 48 hours. For the study in vivo, we used 42 mice immunosuppressed by injections of prednisolone. The induction of experimental candidiasis was performed by inoculation of *C. albicans* (108 cells / mL) on the back of the tongue of animals and administration of tetracycline in drinking water. Next, the mice were treated with three applications of the essential oil of *C. citratus*, *M. alternifolia* or saline (control group) on the back of the tongue. Samples were collected with mouth before and after treatment for recovery of yeasts from the oral cavity of animals and number of CFU / mL. 5 days after induction of experimental candidiasis, the animals were euthanized for histological and electron microscopy of the tongue. The results were statistically analyzed by Tukey's test and Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$). The results obtained in in vitro tests showed that the MIC was 0.195% for *M. alternifolia* and less than 0.01% for *C. citratus*. The microbial reduction observed in biofilms of *C. albicans* was 6.88 and 5.84 log, respectively, for *M. alternifolia* and *C. citratus*. Regarding the recovery of *C. albicans* from the oral cavity of animals, there was a reduction of 6.49 log for microbial *M. alternifolia* and 5.95 for log *C. citratus*. In the microscopic analysis of the tongue, there was colonization of yeasts and hyphae in all experimental groups, no statistically significant difference between groups. However, it was found that the group treated with *Melaleuca alternifolia* showed fewer epithelial lesions in relation to the group treated with *C. citratus* and control. It was concluded that the essential oils of *M. C.citratus alternifolia* and have antimicrobial activity in vitro and in vivo *C. albicans*.

Keywords: Candida albicans. Experimental candidiasis. Immunosuppressed mice. Melaleuca alternifolia. Cymbopogon citratus.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* são, geralmente, comensais da cavidade bucal, trato digestivo, genital e urinário de indivíduos sadios, estando presentes na cavidade bucal de 3 a 48% dos adultos sadios e 45 a 65% das crianças saudáveis (Samaranayake, Samaranayake, 2001). Alterações no ambiente do hospedeiro podem resultar em transição da fase comensal para a patogênica provocando infecções superficiais e até sistêmicas (Samaranayake et al., 2009; Wilson et al., 2009).

Infecções causadas por leveduras como *Candida spp.* representam uma ameaça crescente para a saúde humana. A incidência de infecções por estes microrganismos aumentou significativamente durante os últimos 20 anos devido às infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Viuda-Martos et al., 2007; Tullio et al., 2007). Outros fatores que predispõe à candidose são o uso de próteses dentárias, dispositivos médicos como cateteres, insuficiência renal, nutrição parenteral e terapia com corticóides ou antimicrobianos de largo espectro (Picazo et al., 2008).

A introdução de materiais artificiais no corpo humano tem sido acompanhada pela habilidade dos microrganismos, incluindo espécies de *Candida*, em colonizar estes materiais e formar biofilmes. Os biofilmes protegem os microrganismos dos antimicrobianos e das defesas do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de infecções. Dispositivos como próteses, cateteres, implantes, tubos endotraqueais, marcapassos, e outras variedades de dispositivos facilitam a colonização e formação de biofilme por espécies de *Candida*, que podem afetar e

comprometer severamente o funcionamento destes dispositivos (Ramage et al., 2006).

Embora novos antifúngicos tenham sido produzidos nos últimos 5 anos, algumas fungemias continuam apresentando dificuldades de tratamento. As principais razões para isto incluem resistência antifúngica intrínseca ou adquirida dos microrganismos e disfunções do organismo que podem impedir a utilização de alguns agentes medicamentosos. Além disso, muitos fármacos estão associados com consideráveis efeitos adversos (Pasqualotto, 2008).

O tratamento com antifúngicos polienos (nistatina e anfotericina B) e clotrimazol resultam apenas em melhora transitória da candidose bucal, sendo muito comum a ocorrência de recidivas, principalmente em casos de imunodeficiência. Melhores resultados estão sendo obtidos com antifúngicos sistêmicos como ketoconazol, fluconazol e intraconazol. Entretanto, o uso desses medicamentos provoca efeitos colaterais e pode desenvolver resistência microbiana (Wilson, Mia, 1993; Donnelly et al., 2007). Estudos com tratamentos alternativos estão se tornando relevantes nos últimos tempos (Picazo et al., 2008; Rossi et al., 2005), incluindo as pesquisas com plantas medicinais.

Vários estudos científicos comprovaram que inúmeros extratos vegetais apresentam atividade antimicrobiana devido à presença de princípios ativos, metabólicos secundários como alcalóides, cumarinas, terpenos, entre outros. Esses compostos, em baixas concentrações, exercem inibição sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de micobactérias, leveduras e fungos filamentosos, confirmando a grande importância que tais produtos possuem como perspectivas para a produção de novos produtos farmacêuticos (Lima, 2001; Calixto, (2003).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* demonstrou atividade antifúngica para as leveduras do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, em testes

de difusão em ágar realizados *in vitro* (Silva et al., 2008). O óleo de *Melaleuca alternifolia* é um medicamento fitoterápico tradicionalmente indicado como cicatrizante, hemostático e antiinflamatório, aplicado por via tópica ou como anti-séptico bucal nos tratamentos de ferimentos, queimaduras traumáticas e solares, mau hálito, problemas da infecção da garganta e manchas de pele (Oliveira, 2002). Estudos *in vitro* também sugeriram que *M. alternifolia* é um potente antimicrobiano contra bactérias e fungos (Carson et al., 1995; Harkenthal et al., 1999).

Apesar de vários estudos *in vitro* terem demonstrado que os óleos essenciais de *C. citratus* e *M. alternifolia* apresentaram atividade antimicrobiana, poucos trabalhos foram desenvolvidos *in vivo*. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi testar os óleos essenciais de *C. citratus* e de *M. alternifolia* quanto às suas atividades antimicrobianas *in vitro* e em modelos de animais experimentais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

O Reino Fungi é diverso, apresentando um número estimado de 1,5 milhões de espécies, sendo que aproximadamente 400 espécies foram associadas com doenças humanas. A maioria das micoses invasivas é ocasionada por um pequeno grupo de fungos, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. (Brown et al., 2009).

Embora alguns fungos sejam patógenos primários, ou seja, capazes de causar infecção mesmo na ausência de fatores predisponentes, há um segundo grupo, conhecido como oportunista, que manifesta seu potencial patogênico em hospedeiros com comprometimento imunológico. Neste último grupo estão incluídas as espécies do gênero *Candida* (Stenderup, 1990; Haynes, 2001).

C. albicans é considerada um fungo dimórfico por apresentar duas formas de crescimento: levedura e hifa (Leung et al., 2000). Na forma de levedura, apresenta-se como células globosas, Gram-positivas, ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 a 7 µm de largura por 3 a 14 µm de comprimento. Quando na forma de micélio, apresenta-se como pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, que se alongam a partir das leveduras (Webb et al., 1998; Liu, 2001).

Quando coloniza superfícies epiteliais, *C. albicans* encontra-se na forma leveduriforme. Em ambientes favoráveis promovem desenvolvimento de tubos germinativos e hifas, os quais possuem

habilidade em penetrar no tecido hospedeiro levando à infecções (Järvensivu et al., 2004).

Algumas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da cavidade bucal; entretanto, sob determinadas condições, comportam-se como patógenos oportunistas (Leung et al., 2000; Hannula et al., 2000). A capacidade de *C. albicans* em causar doença está correlacionada como os níveis de imunossupressão do hospedeiro e com a expressão de fatores de virulência pelo fungo, como aderência as células do hospedeiro, hidrofobicidade celular, formação de tubos germinativos e hifas, secreção de proteinase e fosfolipase, e capacidade de formação de biofilme (Pomarico et al., 2009; Ellepola, Samaranayake, 2000; Lyon, Resende, 2006; Nobile, Mitchell, 2006).

C. albicans é a principal espécie do gênero *Candida* associada à candidose, mas outras espécies também são relatadas, como por exemplo *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. guilliermondii* (Menezes et al., 2004). Recentemente, *Candida dubliniensis* foi reconhecida como uma nova espécie, cujas características morfológicas e bioquímicas são muito semelhantes à *C. albicans*, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las (Colombo, Guimarães, 2003; Koga-Ito et al., 2006). O aumento na prevalência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* é preocupante, na medida em que essas espécies são mais resistentes aos agentes antifúngicos comumente utilizados (Bagg et al., 2003; Li et al., 2007).

A infecção causada por espécies de *Candida* é denominada de candidose e geralmente compromete a cavidade bucal, o trato gastrointestinal, região perianal, unhas, endocárdio, pulmões, trato urinário, pele e vagina. As infecções podem permanecer localizadas ou podem disseminar-se. A partir da infecção inicial, em geral localizada no revestimento cutâneo da pele e na mucosa bucal de um hospedeiro imunocomprometido, os fungos podem invadir vasos sanguíneos e

disseminar-se por quase todas as áreas do organismo. A candidose superficial esta entre as infecções mais comuns da pele e mucosas, e tanto a candidose superficial como a profunda constituem problemas de saúde publica (Oliveira, 2009).

A candidose bucal é considerada a "enfermidade do paciente enfermo" (McCarthy et al., 1991), já que necessita de um ou vários fatores predisponentes para a sua instalação (Aguirre Urizar, 2002, Niimi et al., 2010). A candidose têm mostrado recentemente um aumento importante na sua incidência, pois a população em geral é mais exposta aos fatores que favorecem a essa infecção, incluindo a terapia com antibióticos, o tratamento com corticosteróides e medicamentos imunossupressores, transplante de órgãos, diabetes, leucemia, linfoma e outros tipos de câncer, AIDS e desnutrição (Pappas et al., 2009, López-Martínez 2010).

Na candidose bucal outros fatores predisponentes podem estar presentes, como o mau funcionamento das glândulas salivares, próteses mal adaptadas, níveis elevados de hidrato de carbono e tabagismo. A terapêutica envolve tratamento antifúngico adequado, sendo as vezes necessário coleta de amostras para análise laboratorial. Em certos grupos de alto risco, a profilaxia antifúngica reduz a incidência e a severidade das infecções. O prognóstico é bom na maioria dos casos (Akpan,Morgan, 2002).

De acordo com Arendorf e Walker (1979), a língua, o palato e a mucosa jugal são os locais mais afetados pela candidose, pois são os sítios mais freqüente e densamente colonizados em portadores do fungo, sendo que na presença de fatores predisponentes, são os primeiros locais a alcançar uma concentração de microrganismos suficiente para causar manifestação clínica.

O interesse por tratamentos antifúngicos eficientes vem aumentando devido ao crescente número de patógenos fúngicos causados pela maior ocorrência de micoses oportunistas em pacientes

imunocomprometidos. Infelizmente, a maioria dos agentes antimicrobianos é somente fungistática, ou seja, não provocam a morte do microrganismo, apenas inibem a sua multiplicação. Além disso, o uso rotineiro de antimicrobianos leva progressivamente ao aparecimento de linhagens resistentes (Perussi, 2007). Apesar de novos e eficazes medicamentos, os tratamentos muitas vezes não apresentam resultados positivos devido ao uso incorreto do medicamento e também à sua crescente resistência aos antifúngicos (López-Martínez, 2010).

Badiee et al. (2010) investigaram a colonização de espécies de *Candida* na mucosa de pacientes HIV-positivos e verificaram o padrão de susceptibilidade aos antifúngicos. Foram coletadas amostras da mucosa de 273 pacientes soropositivos para HIV. Todos os isolados foram identificados pelo método padrão de assimilação de carboidratos. Isolados fenotipicamente identificados como *C. albicans* ou *C. dubliniensis* foram submetidos à identificação molecular. Padrões de susceptibilidade das espécies isoladas aos antifúngicos foram determinados pelo método de microdiluição em caldo. As espécies mais comumente isoladas foram: *C. albicans* (50%), seguida por *C. glabrata* (21,4%), *C. dubliniensis* (13,3%), *C. krusei* (9,8%), *C. kefyr* (3,1%), *C. parapsilosis* (1,6%), e *C. tropicalis* (0,8%). Todas as espécies foram sensíveis à anfotericina B, cetaconazol, nistatina, voriconazol e caspofungina. Em alguns isolados foi verificada resistência ao fluconazol e itraconazol, que são os antifúngicos mais frequentemente utilizados.

Desse modo, pode-se observar que muitos compostos antifúngicos disponíveis no mercado possuem limitações, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro e por desenvolverem resistências pelos microrganismos do gênero *Candida* (Donnelly et al., 2008).

2.2 Formação de Biofilme por *C. albicans*

Os biofilmes consistem em um conjunto de células embebidas em uma matriz extracelular (Baillie, Douglas, 2000), aderidas irreversivelmente às superfícies sólidas (Costerton et al., 1999; Donlan, Costerton, 2002). Os biofilmes representam a forma mais prevalente de crescimento microbiano na natureza, sendo cruciais para o desenvolvimento das infecções clínicas (Davey, O'Toole, 2000).

A formação de biofilme por *C. albicans* ocorre por adesão de uma camada de células flutuantes leveduriformes à uma superfície, e sobre estas, uma camada de formas filamentosas rodeadas por uma matriz de polissacarídeos (Chandra et al, 2001). O material extracelular produzido pela espécie *C. albicans* contém carboidratos, proteínas e outros componentes ainda desconhecidos, sendo esta composição diferente das células não aderidas (planctônicas). Segundo Baillie e Douglas (2000), o biofilme é muito mais forte e estável do que o crescimento planctônico, apresentando maior resistência aos medicamentos terapêuticos (Kumamoto, 2002).

A superfície para a adesão do biofilme pode ser viva ou inerte. A adesão dos microrganismos é um processo complexo, com muitas variáveis que afetam sua formação (Pratt, Kolter, 1998). Assim, o seu crescimento requer um complexo desenvolvimento de vias metabólicas que envolvem uma série de eventos, os quais são regulados em resposta ao meio ambiente e aos microrganismos (Prakash et al., 2003). A superfície deve ter características que são importantes no processo de adesão, sendo que a colonização microbiana parece se incrementar melhor em superfícies rugosas (Prakash et al., 2003). Características como pH, níveis de nutrientes, ferro, oxigênio, forças iônicas, e temperatura podem ter um papel importante na adesão microbiana à superfície (O'Toole et al., 2000).

O biofilme dentário se forma sobre a película adquirida na superfície dos dentes (Marsh, 1992). Inicialmente, os microrganismos denominados colonizadores primários, se aderem a esta película através de reações físico-químicas. Em condições adequadas, os colonizadores primários multiplicam-se sobre o substrato para formar micro-colônias. Quando ocorrem mudanças nas condições ambientais no interior do biofilme em formação e o substrato existente apresenta-se coberto por bactérias responsáveis pela colonização primária, outros microrganismos tornam-se capazes de se unirem aos primários e a partir deste momento o biofilme começa a se desenvolver com múltiplas espécies (Rickard et al., 2003).

A formação dos biofilmes oferece vantagens para os microrganismos, como aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e maior proteção contra o sistema imune do hospedeiro (Eick et al., 2004; Jorge, 2007; Wiles et al., 2008). Os microrganismos organizados em biofilmes apresentam características de resistência, principalmente devido à penetração insuficiente de antimicrobianos, velocidade de crescimento e alteração do estágio metabólico que garante a sobrevivência de tais células em ambientes hostis (Stewart, Costerton, 2001). Adicionalmente, os biofilmes apresentam característica de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos, quando comparados com as mesmas células em culturas planctônicas, o que os tornam mais resistentes aos antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro (Davey, O'Toole, 2000; Zanin et al., 2006).

A dificuldade no tratamento de infecções causadas por biofilmes de *Candida* deve-se principalmente a duas características: resistência aos antifúngicos e reduzida suscetibilidade ao sistema imune do hospedeiro (Nett et al., 2009). Os mecanismos de resistência aos azóis são os mais estudados em biofilmes de *Candida*, por estes serem muitas vezes resistentes à esta classe de antifúngicos (Chandra et al., 2005).

Uma variedade de manifestações de infecções causadas por espécies de *Candida* está associada com a formação de biofilme em dispositivos médicos implantados (Douglas, 2002; Kumamoto, 2002). Estes dispositivos geram superfícies adequadas para formação de biofilme e, conseqüentemente, são responsáveis pela alta porcentagem de candidose invasiva (Ramage et al., 2006). Assim, a introdução de materiais artificiais dentro do corpo, tem sido acompanhada pela habilidade do microrganismo, incluindo espécies de *Candida*, de colonizar estes materiais e formar biofilme, cuja estrutura os protege dos antimicrobianos e das defesas do hospedeiro, contribuindo para a existência de infecções (Ramage et al., 2006).

Experimentos *in vitro* sugerem que os microrganismos organizados em biofilme podem se tornar cerca de 50 a 500x mais resistentes aos antimicrobianos do que microrganismos na forma planctônica. A infecção nestes casos só é resolvida a partir da retirada dos implantes infectados, levando a uma maior morbidade e mortalidade dos pacientes (El-Aziz et al., 2005).

Hawser e Douglas (1995) avaliaram a suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, 5-fluorocitosina, itraconazol e cetoconazol e observaram que estes biofilmes foram altamente resistentes à estes antifúngicos, permanecendo 5 a 8 vezes mais metabolicamente ativos do que as células planctônicas e 30 a 2000 vezes mais resistentes do que a Concentração Inibitória Mínima no crescimento planctônico (CIM).

Mohandas e Ballal (2011) afirmam que espécies de *Candida* são habitantes normais da pele e mucosa e que a importância epidemiológica de leveduras envolvidas em processos patogênicos é inquestionável, devido ao aumento dessas infecções durante a última década. Eles avaliaram amostras clínicas do trato respiratório (escarro, lavado brônquico, secreção traqueal), saliva, sangue, urina, secreção do ouvido médio, úlcera de córnea e dispositivos de plástico (tubo

endotraqueal, ponta do cateter e ponta de sucção) que foram coletados e cultivados. As espécies de *Candida* isoladas foram identificadas. Um total de 111 isolados de espécies de *Candida* foi recuperado a partir de 250 diferentes fontes clínicas. A espécie *C. albicans* foi isolada em 39,64% dos casos e as espécies de *Candida* não *albicans* em 60,36%. Em hemoculturas, *C. krusei* (38,23%) e *C. albicans* (20,58%) foram isoladas com frequência. *C. albicans* (63,27%) foi a espécie predominante na superfície da mucosa. Infecções urinárias causadas por leveduras foram mais frequentes em pacientes hospitalizados, sendo comumente isoladas espécies de *C. krusei* (50,0%) e *C. albicans* (25,0%).

Esses autores, também verificaram que as espécies de *Candida* não *albicans* produziram mais proteinase do que a espécie *C. albicans*. Entretanto para fosfolipase, as espécies de *C. albicans* produziram altos níveis em comparação com as espécies de *Candida* não *albicans*. Vários fatores de virulência como, biofilme e produção de proteinase e fosfolipase contribuem para a patogenicidade do gênero *Candida*. A detecção precoce dos fatores de virulência de *Candida* pode ser útil na tomada de decisão clínica e os dados deste trabalho sugerem que a capacidade das espécies de *Candida* de produzir biofilme pode ser um reflexo do potencial patogênico dos isolados.

2.3 Candidose bucal experimental

Muitos trabalhos foram desenvolvidos em animais para estudar a ação de fatores predisponentes para a candidose bucal e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Ratos e camundongos têm sido muito utilizados por desenvolverem lesões de candidose experimental na cavidade bucal após inoculações orais de *C. albicans*, apresentarem baixo custo e facilidade de manuseio. O

camundongo apresenta vantagem em relação ao rato, uma vez que sua microbiota bacteriana é conhecida e restrita a menos de 20 espécies. (Trudel, 1986). Além disso, *C. albicans* não faz parte da microbiota bucal deste animal (Lacasse et al., 1990).

Totti et al. (1998) verificaram colonização de *C. albicans* e desenvolvimento de candidose na cavidade bucal de camundongos normais e sialoadenectomizados após uma e quatro inoculações de *C. albicans*. A xerostomia, produzida pela sialoadenectomia nos camundongos, propiciou recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal dos animais em maior número e por períodos mais prolongados. Além disso, nos animais sialoadenectomizados, as lesões de candidose no dorso da língua foram mais extensas em relação aos camundongos normais.

Martinez et al. (2001) avaliaram o efeito de um medicamento (GM237354) derivado do sordarin com um amplo espectro de atividade contra de fungos. Os efeitos terapêuticos desse medicamento foram investigados em um modelo de candidose bucal em ratos imunossuprimidos com dexametasona na água de beber. As inoculações de *C. albicans* foram realizadas em três dias alternados. GM237354 foi administrado três vezes por dia durante sete dias consecutivos. GM237354 administrado nas doses de 5, 7,5, 10, 15 ou 30 mg/kg/dia reduziu significativamente o número de UFC/mL na cavidade bucal dos ratos em relação ao grupo sem tratamento (Controle). Estes resultados demonstraram que o GM237354 foi eficaz contra a candidose bucal em ratos imunossuprimidos, sendo necessários o desenvolvimento de mais estudos para determinar o seu potencial para uso em humanos.

Takakura et al., (2003) observaram o desenvolvimento de um modelo de candidose pseudomembranosa na cavidade bucal de camundongos, por meio da utilização de um sedativo durante a inoculação do microrganismo. Sete dias após a inoculação de *C. albicans*,

foram realizadas recuperações de leveduras da cavidade bucal e análises macroscópicas das lesões no dorso da língua. Esses autores verificaram que o grau de infecção aumentou conforme o tempo de sedação, e demonstraram que 10 mg/kg de clorpromazina (3 horas de sedação) foi a dose ideal para esse modelo de candidose experimental. Além disso, os autores observaram que a contagem de leveduras (UFC/mL) recuperadas da cavidade bucal estavam relacionadas com a quantidade de lesões de candidose pseudomembranosa formadas na língua, sugerindo que as lesões clínicas indicaram o grau de colonização por *C. albicans* na cavidade bucal.

Kamagata-Kiyoura et al. (2004) estudaram as propriedades anti-*Candida* da saliva humana em modelos de candidose em camundongos. A candidose bucal experimental foi estabelecida pela inoculação de *C. albicans* 24 horas após a administração de prednisolona. Esses camundongos receberam por via oral, 0,1 mL de saliva humana aquecida a 60°C ou a 100°C, e água destilada estéril como grupo controle. A saliva humana foi aplicada na cavidade bucal dos camundongos por 5 vezes em intervalos específicos de 3, 6, 12, 24 e 36 horas após a inoculação de *Candida*. Os resultados mostraram que a contagem de células viáveis foram significativamente menores no grupo de saliva humana à 60°C do que no grupo onde foi aplicado saliva à 100°C ou água destilada. Os animais que receberam aplicação de saliva aquecida a 100°C por 20 minutos apresentaram os mesmos resultados dos animais do grupo controle. Estes resultados sugerem que a administração da saliva humana pode inibir a colonização da cavidade bucal por *C. albicans*.

No estudo de Chami et al. (2005), foi avaliado *in vivo* a ação de dois componentes dos óleos essenciais de orégano e cravo, o carvacrol e o eugenol. A indução da candidose bucal em ratos imunossuprimidos ocorreu por meio da administração de dexametasona e inoculações de *C. albicans* em três dias alternados. Os animais

receberam aplicação tópica de 0,5 mL de carvacrol a 0,2%, eugenol a 0,4% e solução fisiológica (grupo controle) na cavidade bucal 2 vezes por dia durante 8 dias consecutivos. Carvacrol e eugenol reduziram significativamente o número de UFC/mL de *C. albicans* dos animais tratados comparados ao controle. A eficácia contra a candidose bucal experimental nos leva a considerá-los como possíveis antifúngicos.

Junqueira et al. (2009) induziram candidose experimental por inoculações orais de *C. albicans*. Após 7 dias, a lesão de candidose formada no dorso da língua foi tratada com terapia fotodinâmica. Os grupos que receberam terapia fotodinâmica (L+F+) exibiram menor alteração epitelial e menor resposta inflamatória crônica em relação ao grupo tratado apenas com solução fisiológica (L-F). O grupo tratado apenas com laser (L+F-) apresentou lesões epiteliais e resposta inflamatória crônica mais intensa do que os demais grupos. O grupo tratado apenas com fotossensibilizador (L-F+) demonstrou lesões teciduais semelhantes ao grupo (L-F-).

Mima et al. (2010) avaliaram a efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida albicans* em camundongos imunossuprimidos. Após a indução de candidose experimental no dorso da língua, foi realizado o tratamento utilizando hematoporfirina nas concentrações de 400, 500 e 1000 mg/L, e Diodo Emissor de Luz (LED) com comprimentos de onda de 455 e 630 nm. A terapia fotodinâmica resultou em redução significativa no número de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações do fotossensibilizador e comprimentos de onda do LED testados. Além disso, a análise histológica do dorso da língua revelou que a PDT não provocou efeitos adversos na mucosa local.

Taguchi et al. (2010) estudaram os efeitos de extratos de plantas medicinais sobre *C. albicans* em ensaios *in vitro* e em modelos *in vivo* de camundongos imunossuprimidos. No estudo *in vitro*, os autores

observaram que os extratos de *Cymbopogon citratus*, *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Hibiscus sabdariffa*, *Camellia sinensis* e *Cinnamomum cassia* inibiram a formação de micélio por *C. albicans*. Os extratos com maior atividade antimicrobiana (*C. citratus*, *C. sinensis* e *C. cassia*) foram submetidos ao estudo *in vivo*, no qual verificou-se que a administração oral de *C. citratus* e *C. sinensis* não resultou em melhora significativa da candidose bucal experimental, enquanto que a administração de *C. cassia* diminuiu as lesões de candidose e reduziu o número de leveduras de *Candida* recuperadas da cavidade bucal dos animais.

Martins et al. (2011) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a patogenicidade de *Candida albicans* na candidose bucal em ratos. Após 5 dias da indução da candidose, foram realizados diferentes tratamentos: laser e azul de metileno como fotossensibilizador (Grupo L+F+), apenas laser (Grupo L+F-), apenas fotossensibilizador (Grupo L-F+) e grupo sem laser e fotossensibilizador (Grupo L-F-). A capacidade de produção de fosfolipase e proteinase por *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal foram avaliadas em todos os grupos experimentais. Os resultados demonstraram que a quantidade de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos ratos foi semelhante entre os quatro grupos estudados. Na análise microscópica do dorso da língua, foi observada a presença de lesões teciduais mais intensas no grupo controle. Em relação aos fatores de patogenicidade de *C. albicans*, o grupo L+F+ produziu menor quantidade de fosfolipase e proteinase em relação aos demais grupos. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica foi eficaz no tratamento da candidose bucal induzida por *C. albicans* e inibiu a produção de fosfolipase e proteinase por essa espécie.

2.4 Óleos essenciais de *C. citratus* e *M. alternifolia*

Durante séculos, as plantas medicinais eram a única fonte de agentes terapêuticos para o ser humano. A diversidade da utilização destas foi resultante do conhecimento empírico da ação dos vegetais nas doenças por diferentes grupos étnicos. Na atualidade, muitas destas plantas são incluídas na terapêutica convencional para tratamento de varias doenças (Vieira 2005; Mantilla, 2005). Assim como, o desenvolvimento da sociedade humana, essa sistemática esteve intimamente ligada ao uso dos recursos naturais que estavam a disposição da humanidade. Ainda hoje todos os aspectos ligados ao conhecimento sobre as plantas medicinais continuam evoluindo, permitindo-se alcançar novas perspectivas na utilização desse recurso (Cunha, 2009).

As substâncias antimicrobianas sintéticas representam um dos maiores avanços dentro da Microbiologia, pois esses agentes possuem efeitos sobre espécies microbianas patogênicas e oportunistas, as quais são responsáveis pelas mais diversas doenças que podem afetar o homem, os animais e as plantas. Dentro desse contexto, o interesse e os estudos com produtos naturais oriundos de plantas têm sido crescentes em vários países, que têm como objetivo principal a possibilidade de isolar substâncias menos tóxicas com potentes atividades farmacológicas, incluindo ações antibacterianas e antifúngicas (Lima, 2006).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta. O país possui a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Atualmente, aproximadamente 48% dos medicamentos

empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem uma importante fonte para obtenção de medicamentos (Carvalho et al., 2007).

Os óleos essenciais podem estar constituídos por mais de 60 componentes individuais, sendo que os componentes principais podem compreender, aproximadamente, até 85% do óleo essencial (Senatore, 1996). Uma característica importante, responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam, são os componentes hidrofóbicos que permitem a quebra de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeável (Sikkema et al., 1994).

De forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos etéreos ou essências. A designação de óleo se dá graças a algumas características físico-químicas como, por exemplo a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica consiste na volatilidade, que o difere assim, dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes. Outra característica se deve ao aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo por isso, também chamados de essências. São solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, recebendo, por isso, o nome de óleos etéreos ou, em latim, *aetheroleum*. Possuem uma solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar essas soluções que são chamadas de hidrolatos (Simões et al., 2003).

A atividade biológica de óleos essenciais e extratos de plantas tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas no combate a diversos tipos de infecções pela medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana, com inibição

comprovada contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Hulin et al., 1998).

Melaleuca alternifolia, conhecida como “Tea Tree”, pertence à família da *Myrtaceae*. É uma árvore pequena, apresentando no máximo 7 metros de altura. Possui casca fina, semelhante à folhas de papel, e folhas afiladas. (Vieira, 2002). É nativa da costa sudeste da Austrália, região de New South Wales, e cresce em regiões pantanosas ou próximas a rios.

O responsável pelo nome “Tea Tree”, dado a *Melaleuca*, foi o capitão James Cook, em 1770. Ao desembarcar com seus homens na baía de Botany, na Austrália, ele observou que os aborígenes faziam um chá medicinal com folhas de um arbusto verde-escuro e contavam histórias de uma lagoa mágica na qual as folhas tinham caído e onde a tribo do lugar se banhava para manter a saúde. O óleo de “Tea Tree” passou a fazer parte tanto da medicina natural dos aborígenes quanto da cultura dos australianos (Oliveira, 2002).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é um antisséptico conhecido por possuir atividade antimicrobiana sobre um amplo espectro de patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) e *Candida albicans* (Woollard et al., 2007).

Mondello et al. (2006) avaliaram as propriedades antifúngicas dos componentes bioativos do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, por meio de estudo *in vitro* em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, e estudo *in vivo* na candidose vaginal induzida por *C. albicans* em modelos de ratas ovariectomizadas. Os autores concluíram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou atividades fungistáticas e fungicidas para todas as espécies de *Candida* estudadas. Em relação ao estudo *in vivo*, verificou-se que 3 semanas após a indução de candidose experimental, os animais tratados com óleo essencial apresentaram

resolução completa do processo infeccioso, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram persistência da infecção.

Jandourek et al. (1998) avaliaram a eficácia da solução oral de *Melaleuca* para tratamento de candidose bucal em pacientes com AIDS, que apresentavam resistência ao fluconazol. Os pacientes receberam 15 mL de solução oral de *Melaleuca* quatro vezes ao dia, durante 2 a 4 semanas. Após esse tratamento, não houve recidivas clínicas nos pacientes que haviam sido curados, sendo assim a *Melaleuca* parece ser uma alternativa eficaz para o tratamento da candidose bucal.

Vazquez, Zawawi (2002) avaliaram a eficácia de soluções orais de *M. alternifolia* em 27 pacientes HIV positivos com candidose orofaríngea e refratária ao fluconazol. Os pacientes receberam uma solução oral de *M. alternifolia* à base de álcool ou sem álcool 4 vezes ao dia durante 2 a 4 semanas. Todos os isolados de *C. albicans* apresentaram resistência *invitro* ao fluconazol. Verificou-se que 60% dos pacientes demonstraram uma resposta clínica para a solução oral de *Melaleuca* (7 pacientes curados e 8 pacientes com melhora clínica) na avaliação de 4 semanas. Ambas formulações de solução oral de *M. alternifolia* demonstraram ser uma alternativa eficaz para pacientes com AIDS que sofrem de candidose orofaríngea refratária ao fluconazol.

Millar e Moore (2008) descrevem que o óleo de *M. alternifolia* (TTO) tem sido utilizado recentemente como aplicação tópica eficaz para o tratamento de infecções de pele causada por uma variedade de agentes microbianos. Foi detalhado o primeiro relato na revisão de literatura de um tratamento bem sucedido com TTO em pacientes que apresentavam verrugas nos dedos devido ao papiloma vírus humano. TTO foi aplicado topicamente uma vez por dia durante 12 dias, com um resultado positivo, inclusive foi observado completa reepitelização das áreas infectadas.

Um dos mais importantes óleos essenciais comercializados é o óleo essencial de Capim-Limão e é conhecido

internacionalmente como óleo essencial de *lemongrass*. O nome Capim-Limão lhe foi atribuído devido à semelhança com o aroma de limão proveniente do seu elevado teor de Citral (componente constituído pelos isômeros neral e geranial), o qual é utilizado para a produção de vitamina A e betacaroteno (Queiroz, 1993).

Cymbopogon citratus é uma gramínea, conhecida popularmente como capim cidró, capim-cheiroso, erva-cidreira, entre outros, e, em inglês, “lemon grass”. A população utiliza o chá ou abafado, preparado a partir de suas folhas, como calmante, digestivo e em dores de cabeça, antiespasmódico, entre outras aplicações (Schuck et al., 2001).

Seus princípios ativos têm uso comprovado: o citral tem efeito antifúngico (fungicida e fungistático), pesticida, inseticida, antibacteriano (bactericida e bacteriostático), anti-séptico. O geraniol, o citronelol e o mirceno possuem ação anti-séptica, fungicida, insetífuga, pesticida. Os efeitos da cânfora e do canfeno são atribuídos as funções insetífugas e pesticidas. O eugenol possui atividade fungicida, inseticida, larvicida, vermífugo, antioxidante, anti-séptico (Craveiro et al., 1981; Teske, Trentini, 1995; Dantas, 2003).

Schuck et al. (2001) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo volátil, extratos aquosos e hidroetanólico de *Cymbopogon citratus* em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo volátil apresentou atividade frente aos microrganismos testados, em especial *Candida albicans*.

Schwartz et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de dez óleos essenciais (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus aurantium*, *Leptospermum scoparium*, *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens* e *Salvia sclarea*) contra cepas bacterianas e fúngicas isoladas de infecções vaginais, incluindo

Atopobium vaginae, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides vulgatus*, *Streptococcus agalactiae*, *Lactobacilos*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Os resultados mostraram que *M. alternifolia*, *C. citratus* e *L. angustifolia* apresentaram a menor concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), sendo os óleos essenciais mais potentes contra as bactérias testadas. *C. citraus*, *C. martinii*, *P. graveolens* apresentaram a maior capacidade de inibição contra cepas de *Candida*. No entanto, ainda é necessário o desenvolvimento de estudos clínicos para determinar o uso destes óleos essenciais no combate de doenças.

Silva et al. (2008) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* (Destilaria Maripá, Brazil) e do citral (Sigma-Aldrich, Alemanha), o principal componente do óleo essencial dessa planta, sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* por meio de estudo *in vitro*, utilizando teste de difusão em ágar. O óleo essencial de *C. citratus* utilizado foi submetido à cromatografia gasosa e revelou conter 76% de citral. Os resultados demonstraram que o óleo essencial e o citral apresentaram atividade antimicrobiana para todas as espécies estudadas, sendo que a maior redução antimicrobiana foi verificada na espécie *C. albicans*. Por outro lado, *C. krusei* foi a espécie mais resistente ao óleo essencial de *C. citratus* e ao citral.

Irkin, Korukluoglu (2009) avaliaram os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre importantes fungos como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, e *Penicillium roquefortii*, *Candida albicans*, *Candida oleophila*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum* e *Metschnikowia fructicola*. Utilizando testes de difusão em ágar e diluição em caldo, foi verificado que esses fungos podem ser controlados pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, podendo então ser aplicado na prática como um agente antifúngico de alimentos e produtos farmacêuticos.

Wright et al. (2009) realizaram um estudo clínico na África do Sul, no qual a eficácia do suco de limão e da infusão de *Cymbopogon citratus* foi testada no tratamento da candidose bucal pseudomembranosa em pacientes HIV positivos. Os pacientes do grupo controle foram tratados com Solução aquosa a 0,5% de violeta genciana. Os resultados encontrados mostraram uma maior eficácia da infusão do *Cymbopogon citratus* em relação ao tratamento controle com solução aquosa de violeta genciana, sendo que o suco de limão também se mostrou melhor que a solução aquosa de violeta genciana.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) determinar a Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* em culturas planctônicas de *C. albicans* pelo método de diluição em caldo;
- b) avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *M.alternifolia* e de *C. citratus* sobre biofilmes de *C. albicans* por meio da contagem de UFC/mL e microscopia eletrônica de varredura;
- c) analisar os efeitos de *M. alternifolia* e *C. citratus* na recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal de camundongos imunossuprimidos;
- d) estudar a ação dos óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* na candidose bucal na língua de camundongos imunossuprimidos por análise de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Princípios Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP sob protocolo nº 024/2009-PA/CEP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). (Anexo A)

4.2 Preparo dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia*

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* foram adquiridos na Universidade Federal de Viçosa/UFV com a colaboração do Prof. Antônio Lelis Pinheiro. A UFV possui a identificação botânica das plantas que foram estudadas, assim como o depósito das exsicatas (Figura 1) em herbário próprio dessa Universidade.

A planta *M. alternifolia* está deposita no herbário sob o número de registro 30839, data: 13/11/2006 e a planta *C. citratus*, registro número 23685, data: 30/07/1999. Ambos os óleos foram obtidos pela técnica de arraste a vapor.



Figura 1 - Exsicata da planta *M. alternifolia*

4.3 Efeitos antimicrobianos de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans* - Estudo *in vitro*

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* em culturas planctônicas de *C. albicans*

Esse teste foi realizado de acordo com as normas NCCLS (M27-A2). A cepa padrão de *C. albicans* ATCC 18804 foi semeada em

ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubada a 37°C por 24 horas. A partir do crescimento, cinco colônias foram suspensas em 5 mL de solução fisiológica estéril (8,5 g/L NaCL) e submetidas ao agitador vortex durante 15 segundos. A seguir, a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284, acrescentando-se solução fisiológica suficiente para se obter uma concentração equivalente a uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 (10^6 células/mL). A partir dessa suspensão-padrão, foi realizada diluição 1:50 seguida de diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640, resultando em uma suspensão de trabalho contendo 10^3 células/mL.

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos de *C. citratus* e *M. alternifolia*, foram testadas várias concentrações: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,195%, 0,09%, 0,04%, 0,02% e 0,01%. As diluições foram realizadas em meio RPMI 1640. Foi utilizado o meio RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Himedia, Mumbai, Índia), tamponado com MOPS 0,165, pH 7,0 (Amresco, Ohio, EUA) e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e 47 mm diâmetro (TPP, Trasadingen, Suíça). Após homogeneização, foi acrescentado Tween 80 (Vetec, Rio de Janeiro, RJ) na concentração final de 0,01% v/v. A seguir, foram acrescentados 100 µL da suspensão de *Candida* padronizada em cada diluição do óleo nas placas de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA).

No grupo controle positivo, foram acrescentados aos poços 100 µL da suspensão padronizada e 100 µL do RPMI 1640, e para a verificação da ação antifúngica do Tween 80 foram acrescentados aos poços 100 µL da suspensão padronizada e 100 µL do meio RPMI 1640 com 0,01% de Tween 80.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Após incubação por 24 horas a 37° C, foi realizada a leitura por meio da

observação visual da turvação do meio. A CIM foi considerada a menor concentração dos óleos testados, capaz de inibir o crescimento microbiano em caldo.

4.3.2 Efeitos de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre biofilmes de *C. albicans*

4.3.2.1 Formação de biofilme de *C. albicans* e aplicação dos óleos essenciais

A cepa de *C. albicans* ATCC 18804 foi cultivada a 37°C por 18 h em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA). A seguir, uma alçada da levedura foi inoculada em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Difco, Detroit, USA) acrescido com 100 mM de glicose. Após 16 horas de incubação, que corresponde ao final da fase do crescimento exponencial, o microrganismo foi centrifugado a 5000 Xg por 5 minutos e lavado duas vezes com 5 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). A seguir, foi novamente centrifugado e ressuscitado em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Difco, Detroit, USA) acrescido com 100 mM de glicose. A suspensão foi padronizada na concentração de 10^7 células/mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,381.

Para formação do biofilme, 250 µL da suspensão do microrganismo foram colocados nos poços da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). A placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37°C por 90 min para fase inicial de adesão. Decorrido este período, o caldo foi gentilmente aspirado e cada poço foi lavado com 250 µL de solução

fisiológica tampão fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido por 2 vezes para a remoção das células não aderidas. Em seguida foi pipetado 250 µL de YNB (Difco, Detroit, USA) acrescido de 100 mM de glicose e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em agitação (Quimis, Diadema, São Paulo). O caldo foi trocado após 24 horas.

Após o período de incubação, o conteúdo da placa com os biofilmes formados foi aspirado. Em seguida, foi adicionado 250 µL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS) e as placas foram colocadas em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) por 5 minutos, para remoção das células não aderidas ao biofilme, após agitação o PBS foi removido.

Após esses procedimentos os óleos essenciais foram adicionados aos biofilmes formados no fundo da placa. A concentração testada foi de 12,5 %. Os biofilmes permaneceram imersos em cada óleo essencial por 5 min em agitação orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Para o controle, sobre os biofilmes foi colocado solução fisiológica tampão fosfato (PBS) pelo mesmo período de tempo.

4.3.2.2 Análise do biofilme por contagem de UFC/mL

Os testes para contagem de UFC/mL do biofilme foram realizados em triplicata. Após a aplicação do óleo essencial, o fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foi cuidadosamente raspado com um palito de madeira estéril. A seguir 100 µL do conteúdo resultante de cada poço foi aspirado e transferido para um tubo falcon contendo 10 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS).

Os tubos foram homogeneizados por 30 segundos em homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 - Bandelin Eletronic) com potência de 50 W, para desprender o biofilme. A solução contendo

PBS e biofilme desprendido foi considerada como fator de diluição 10^{-1} , a partir desta, foram feitas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foi semeada em placas de ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e os valores transformados em logaritmo.

4.3.2.3 Análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizado como corpo-de-prova uma peça de poliestireno com 8 mm de diâmetro e colocados em placa de 24 poços para aderência do biofilme. Os grupos submetidos à análise foram: *C. citratus* (n= 2), *M. alternifolia* (n= 2) e Controle (n=2). Os biofilmes foram formados e tratados conforme descrito no item 4.3.2.1. A seguir, as peças foram transferidas para placa de 24 poços contendo 1mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora, após foram submersas em 1mL de soluções de álcool nas concentrações de 10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 minutos e, posteriormente, em 100% de álcool por 1 hora. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para secagem completa das peças.

Após, as peças foram retiradas do fundo da placa com o auxílio de uma pinça, transferidas para *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 160 segundos a 40 milianperes (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, as peças foram examinadas e fotografadas em MEV (Jeol JSM5600).

Os procedimentos de Microscopia Eletrônica de Varredura foram executados na disciplina de Patologia da Faculdade de

Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP.

4.4 Efeitos antimicrobianos de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans* - Estudo *in vivo*

4.4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 42 camundongos machos provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, sendo 36 animais utilizados para o estudo da candidose experimental por *C. albicans* e 6 sem indução de candidose experimental. A distribuição dos animais e grupos experimentais foi descrita no Quadro 1.

4.4.2 Verificação de colonização natural por *Candida* spp. na cavidade bucal dos camundongos

Antes de iniciar a indução de candidose experimental por *C. albicans*, foi verificada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Para isto foi coletado, com o auxílio de um swab estéril, material de toda a cavidade bucal, principalmente do dorso da língua. O swab foi imediatamente semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol por mL de meio (Vixmicina, São Paulo, Brasil). As placas

foram incubadas a 37°C por 48 horas. Foram utilizados somente animais com cultura negativa para *Candida* spp. na cavidade bucal.

Quadro 1 - Quadro da distribuição dos animais nos grupos experimentais

Camundongos	Tratamentos Experimentais	Análise dos resultados	Número de animais	Total
Com Indução de candidose experimental	<i>C. citratus</i>	MO	10	36
		MEV	2	
	<i>M. alternifolia</i>	MO	10	
		MEV	2	
	Controle	MO	10	
		MEV	2	
Sem Indução de candidose experimental	<i>C. citratus</i>	MO	2	6
	<i>M. alternifolia</i>	MO	2	
	Controle	MO	2	

MO: Microscopia óptica, MEV: Microscopia eletrônica de varredura

4.4.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina

Os animais foram imunossuprimidos com duas injeções subcutâneas de prednisolona (Depo- Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, Brasil) na região da calvária na dose de 100 mg/Kg de massa corporal 1 dia antes e 3 dias após a inoculação com *Candida*.

Na água de beber foi administrado cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer) na concentração de 0,83 mg/mL iniciado 1 dia antes da inoculação e mantido até o final do experimento. A imunossupressão e administração de tetraciclina foram realizadas de

acordo com o modelo experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003) e utilizado por Mima et al. (2010).

4.4.4 Preparo da suspensão de *C. albicans*

Cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) foi semeada em placa de ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 48 horas. A seguir, o crescimento foi suspenso em 5 mL de PBS e centrifugado a 1300 Xg durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido novamente. O sedimento foi suspenso em 5 mL de PBS e padronizado em 10^8 células/mL em espectrofotômetro (530 nm e densidade óptica de 2900).

4.4.5 Inoculação da suspensão de *C. albicans* na cavidade bucal dos camundongos

Os camundongos foram anestesiados via intramuscular com injeções de cloridrato de clorpromazina (Amplictil, Sanofi Aventis, Suzano, São Paulo) na dose de 10 mg/Kg de massa corpórea no volume de 50 µL em cada pata. A inoculação ocorreu com auxílio de swab (Absorve, Cral, São Paulo, SP) previamente embebido na suspensão do microrganismo, que foi passado sobre o dorso da língua. Os animais do grupo sem indução de candidose experimental (6 camundongos) receberam tetraciclina na água de beber e foram imunossuprimidos, conforme item 4.4.3. Entretanto, não receberam inoculações de *C. albicans* no dorso da língua.

4.4.6 Aplicação do óleo essencial

Após 4 dias da inoculação de *C. albicans*, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de ketamina (União Química, São Paulo, Brasil) na concentração de 100 mg/Kg de peso corporal e Xylazina (Produtos Veterinários, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/Kg de peso corporal, para aplicação do óleo essencial.

As concentrações dos óleos essenciais que foram utilizadas foi de 12,5% para *M. alternifolia* e 3,12% para *C. citratus*, definidas de acordo com os resultados obtidos no estudo realizado *in vitro*. O óleo essencial foi pipetado no dorso da língua no volume de 50 µL por 3 vezes em intervalos de 10 min. No grupo controle foi pipetado solução fisiológica no mesmo volume e frequência.

4.4.7 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos

Antes e imediatamente após a realização de cada tratamento experimental, foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais com um swab estéril por 1 minuto. As amostras foram imediatamente colocadas em tubos de ensaio contendo 0,99 mL de PBS, e agitado durante 30 segundos, considerando-se a diluição como sendo 10^{-2} a partir da qual foram realizadas diluições seriadas. A seguir, 0,1 mL de cada diluição foi semeado em duplicata na superfície de placas de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas a 37°C por 48 horas. Foram contadas colônias típicas de *C.albicans* em placas que apresentaram de 30 a 300 colônias para a determinação de UFC/mL.

4.4.8 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos camundongos foi realizada 1 dia após o tratamento experimental administrando-se dose excessiva de anestésico. A seguir, as línguas foram removidas para a realização das análises macroscópica e microscópica.

4.4.9 Análise macroscópica de *C. albicans* no dorso da língua

Durante a realização dos tratamentos experimentais e após a eutanásia dos animais, as línguas foram analisadas em lupa estereoscópica (Zeiss) com aumento de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes, pesquisando-se a presença de lesões características de candidose no dorso da língua dos camundongos. Para avaliação da extensão das lesões foram atribuídos escores de 0-4: 0, normal; 1, placas brancas em menos de 20%; 2, placas brancas variando de 21-90%; 3, placas brancas em mais de 91%; 4, placa branca espessa como pseudomembranas em mais de 91% (Takakura et al., 2003).

4.4.10 Análise microscópica do dorso da língua

Para a análise microscópica, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 horas e seccionadas em duas partes no sentido sagital. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura, que foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A presença de candidose foi pesquisada em toda a superfície do dorso da língua e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com a presença de leveduras e hifas, localização e extensão das lesões e alterações dos tecidos envolvidos.

A presença de leveduras e hifas foi quantificada de acordo com a metodologia de Junqueira et al. (2005), atribuindo-se os seguintes escores para os campos histológicos: 0, ausência de leveduras e hifas; 1, de 1 a 5; 2, de 6 a 15; 3, de 16 a 50; 4, mais de 50.

As lesões teciduais foram quantificadas analisando-se 18 campos histológicos no dorso da língua de cada animal. Em cada campo histológico foi observada a presença ou ausência das seguintes lesões teciduais: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, exocitose, espongiose, perda das papilas filiformes e formação de microabscessos intraepitelial. Para o infiltrado inflamatório crônico, foram atribuídos para cada campo histológico os seguintes escores: 0 (ausência de células inflamatórias), 1 (infiltrado inflamatório discreto), 2 (infiltrado inflamatório moderado) e 3 (infiltrado inflamatório acentuado).

4.4.11 Microscopia eletrônica de varredura da língua do camundongo

Para a observação em microscopia eletrônica de varredura, as línguas dos camundongos de cada grupo experimental (n=2) foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1 M e pH 7,3) por 24 horas a 4°C.

As peças foram lavadas três vezes com tampão fosfato (0,2M e pH 7,3), sendo que cada lavagem teve duração de 10 min. A seguir, as peças foram fixadas em tetróxido de ósmio tampão fosfato (0,2M e pH 7,3) a 1% durante 1 hora. Após mais duas lavagens com esse tampão, os espécimes foram submetidos à desidratação com

concentrações crescentes de acetona: 50% por 30 min, 70% por 30 min, 90% por 30 min e 100% por uma hora. Após a desidratação, foi realizada a secagem ao ponto crítico com CO₂ (Denton Vacuum DCP 1 - USA).

As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 160 segundos a 40 miliampères (Denton Vacuum Desk II) e avaliadas em MEV (Jeol JSM5600).

Os procedimentos de Microscopia Eletrônica de Varredura foram executados na disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP.

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos na contagem de UFC/mL do biofilme *in vitro*, na recuperação de UFC/mL de *C. albicans* da cavidade bucal de camundongos e na análise do número de campos histológicos com lesões teciduais microscópicas (lâminas de HE) foram utilizados os testes ANOVA e Tukey.

Para análise dos escores atribuídos às lesões macroscópicas no dorso da língua, à contagem de hifas nas lâminas de PAS e ao infiltrado inflamatório observado nas lâminas de HE foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Toda a análise estatística foi realizada no programa Minitab 14, considerando-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima de *M. alternifolia* e *C. citratus* em culturas planctônicas de *C. albicans*

No teste de concentração inibitória mínima para cultura planctônica de *C. albicans*, o óleo essencial de *M. alternifolia* foi eficiente contra *C. albicans*, demonstrando que na concentração de 0,195% foi capaz de inibir seu crescimento. Já para *C. citratus*, várias concentrações foram testadas: iniciando com 50%, e chegando até a concentração de 0,01%; entretanto todas as concentrações testadas foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*.

5.2 Efeitos de *M. alternifolia* e *C. citratus* sobre biofilmes de *C. albicans*

Várias concentrações destes óleos essenciais foram testadas para verificar a ação em biofilme: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,195%. Em relação ao grupo controle, houve uma redução de biofilme, sendo que para *M. alternifolia*, a menor concentração capaz de reduzir o crescimento de biofilme foi de 12,5% e para *C. citratus* a menor concentração foi de 3,12%. Desse modo, para os testes com biofilme *in vitro*, foi adotada a concentração de 12,5% para *M. alternifolia* e 3,12% para *C. citratus*.

5.2.1 Análise do biofilme por contagem de UFC/mL

Os resultados obtidos na contagem de unidades formadoras de colônias de *C. albicans* (UFC/mL) do biofilme para avaliação da ação dos óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* estão apresentados na Tabela 1 e Figura 2.

Observa-se na Tabela 1 e na Figura 2, que nos dois óleos essenciais testados sobre biofilme houve redução de UFC/mL (Log). Sendo assim, foram aplicados os testes estatísticos ANOVA e Tukey sobre os valores da diferença de UFC/mL entre os dados obtidos. De acordo com o teste de Tukey houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e os óleos essenciais de *M. alternifolia* ($p = 0,001$) e *C. citratus* ($p = 0,001$).

Tabela 1 - Valores de UFC/mL (Log) de *C. albicans* organizadas em biofilmes para avaliação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais estudados

Controle	<i>M. alternifolia</i>	<i>C. citratus</i>
7,00	0	5,97
6,92	0	5,94
6,98	0	5,65
6,89	0	5,69
6,69	0	5,98
6,87	0	5,79
6,88	0	5,99
6,81	0	5,69
6,77	0	5,78

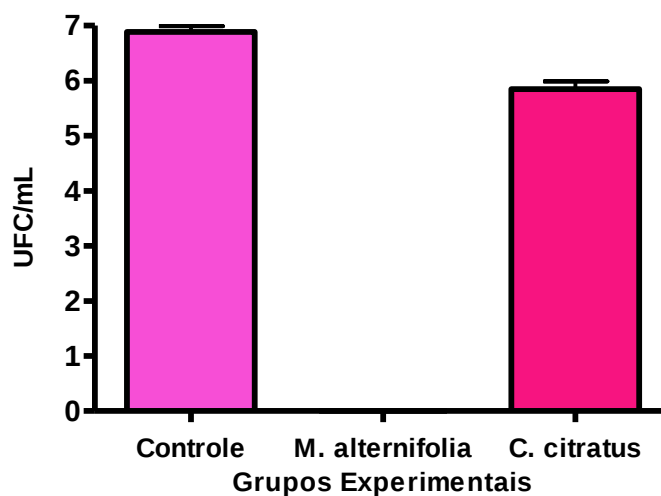


Figura 2 - Médias e Desvios-padrão de UFC/mL de *C. albicans* em biofilmes de acordo com os diferentes grupos experimentais.

5.2.2 Análise do biofilme por MEV

Observa-se na Figura 3, que no grupo controle há um biofilme denso com grande quantidade de leveduras e hifas, demonstrando que o procedimento utilizado para formação do biofilme foi eficiente. Também observamos na Figura 3 que a aplicação de *M. alternifolia* sobre o biofilme reduziu totalmente o número de leveduras e hifas.

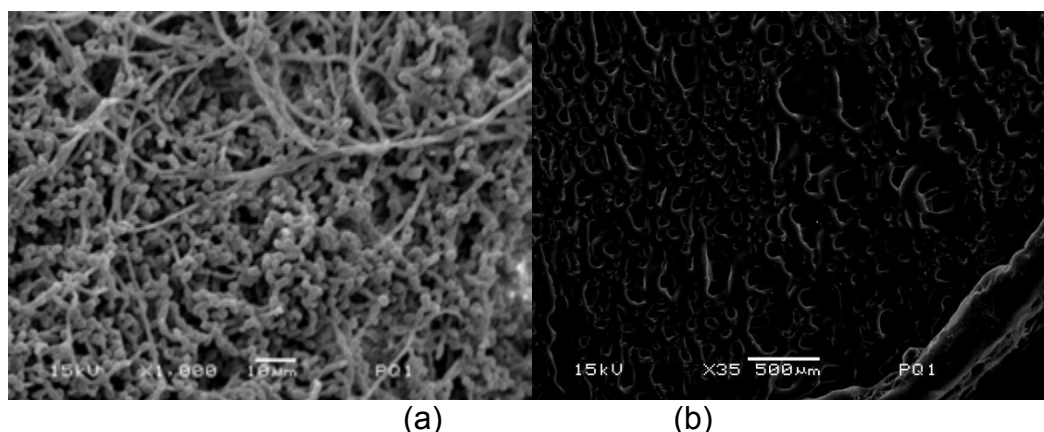


Figura 3 - MEV de biofilmes de *C. albicans* em corpo de prova de poliestireno. a) MEV do corpo de prova do grupo controle, aumento de 1000x; b) MEV do corpo de prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *M. alternifolia*, aumento de 350x.

Na Figura 4 observa-se no grupo controle uma formação consistente de biofilme e no grupo tratado com *C. citratus* vemos uma grande redução no número de leveduras.

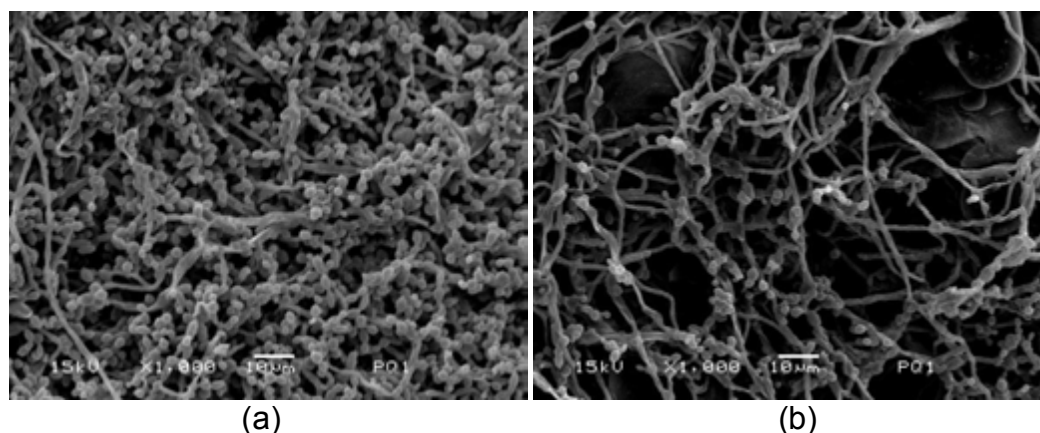


Figura 4 - MEV de biofilmes de *C. albicans* em corpo de prova de poliestireno. a) MEV do corpo de prova do grupo controle, aumento de 1000x; b) MEV do corpo de prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus*, aumento de 1000x.

5.3 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos

Os resultados obtidos na contagem de unidades formadoras de colônia de *C. albicans* (UFC/mL) recuperadas da cavidade bucal dos camundongos antes e após o tratamento experimental com os

óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 5.

Observa-se na Tabela 2 e na Figura 5, que houve redução de UFC/mL (Log) após o tratamento com os óleos essenciais. Sendo assim, foi aplicado teste estatístico de Tukey sobre os valores da diferença de UFC/mL entre os dados obtidos. De acordo com o teste de Tukey houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e os óleos essenciais de *M. alternifolia* ($p = 0,001$) e *C. citratus* ($p = 0,001$).

Tabela 2 - Valores de UFC/mL (Log) obtidos antes (A) e depois (D) do tratamento experimental utilizando os óleos essenciais.

Camundongos	Controle		<i>M. alternifolia</i>		<i>C.citratus</i>	
	A	D	A	D	A	D
1	6,01	5,56	6,22	0	5,50	0
2	5,73	5,17	6,44	3,60	5,55	0
3	6,11	5,58	6,25	4,90	5,95	0
4	5,64	5,45	6,49	0	5,77	0
5	5,52	5,36	5,73	0	5,69	0
6	5,43	5,17	6,13	0	5,77	0
7	5,75	5,67	6,29	0	5,91	0
8	5,66	5,61	5,79	0	5,81	0
9	5,59	5,51	6,35	0	5,79	0
10	6,25	6,14	6,12	0	5,76	0
Média	5,77	5,52	6,18	0,85	5,75	0,00
Desvio-padrão	0,26	0,27	0,25	1,81	0,14	0,00

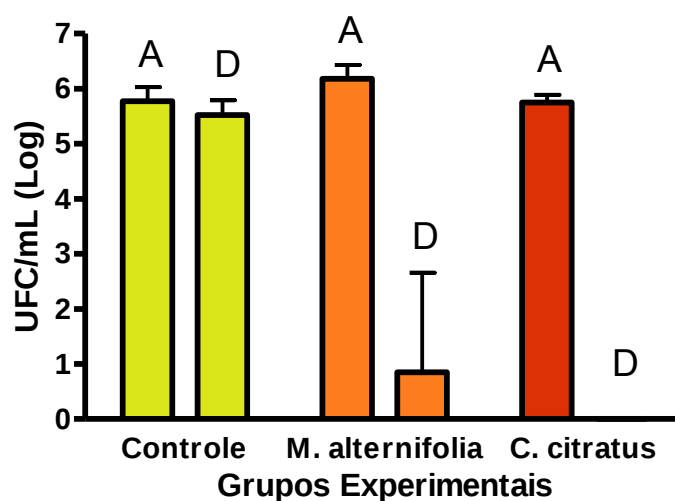


Figura 5 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidos antes e após o tratamento com os óleos essenciais.

Na Tabela 3 e Figura 6, observamos que os óleos essenciais foram eficientes no tratamento da candidose bucal, demonstrando uma redução significativa em Log, sendo que o óleo de *M. alternifolia* foi o que apresentou melhor resultado.

Tabela 3 - Resultados da recuperação após o tratamento com os óleos essenciais, mostrando a redução em Log

Animais	Controle	<i>M. alternifolia</i>	<i>C. citratus</i>
1	0,45	6,22	5,50
2	0,56	2,84	5,55
3	0,53	1,35	5,95
4	0,19	6,49	5,77
5	0,16	5,73	5,69
6	0,26	6,13	5,77
7	0,08	6,29	5,91
8	0,05	5,79	5,81
9	0,08	6,35	5,79
10	0,11	6,12	5,76
Média ± DP	0,24 ± 0,19	5,33 ± 1,75	5,75 ± 0,14

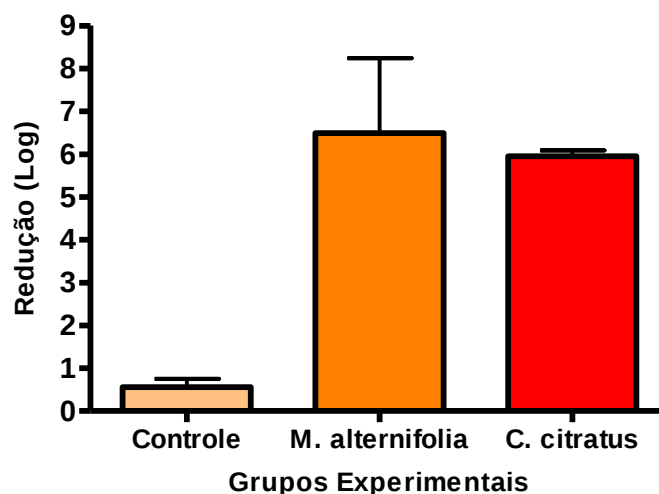


Figura 6 – Redução em Log de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal dos camundongos após o uso dos óleos essenciais.

5.4 Análise macroscópica do dorso da língua dos camundongos

Após a eutanásia dos camundongos foram observadas lesões no dorso da língua caracterizadas por áreas de atrofia papilar localizadas principalmente na região de papilas gigantes. Em todos os camundongos imunossuprimidos foram observadas placas brancas pseudomembranosas que mesmo após o tratamento com óleos essenciais persistiram. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p = 0,857$).

Na Figura 7 podemos observar através do gráfico que não houve diferença nos escores atribuídos aos animais, mostrando que em todos os grupos experimentais as placas brancas estavam presentes. Na Figura 8 observamos um camundongo que apresentava estas placas pseudomembranosas.

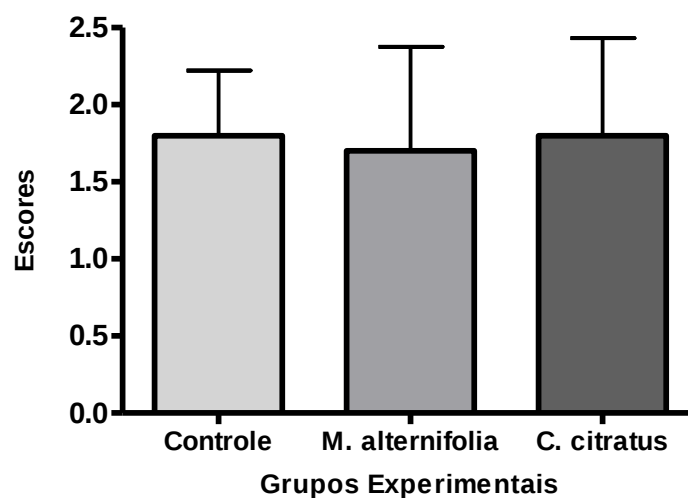


Figura 7 - Médias e Desvios-padrão das lesões macroscópicas observadas no dorso da língua dos camundongos.

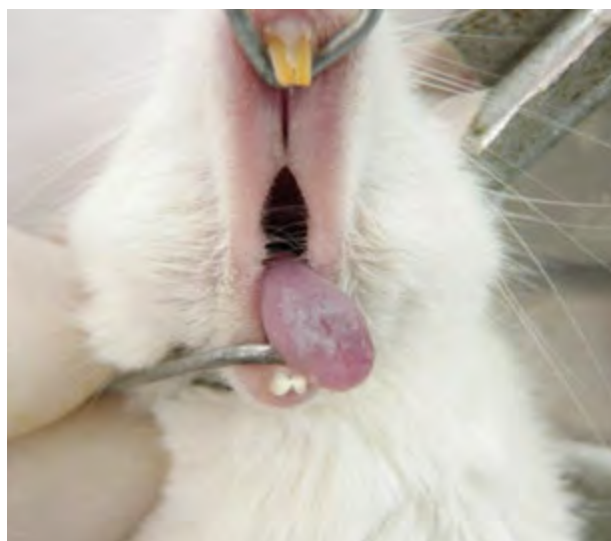


Figura 8 - Camundongo com placas brancas pseudomembranas no dorso da língua.

5.5 Análise microscópica do dorso da língua dos camundongos

Os camundongos foram submetidos à eutanásia 1 dia após o tratamento com os óleos essenciais, o que correspondeu a 5 dias

após a indução da candidose experimental. As lesões de candidose apresentaram quantidades variáveis de leveduras e hifas nas lâminas de PAS, estas lesões estavam presentes em diversas regiões do dorso da língua e houve perda de queratina. As hifas e leveduras foram quantificadas e submetidas à análise estatística de Kruskal-Wallis, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *M. alternifolia*, *C. citratus* e controle ($p = 0,056$), conforme Figura 8.

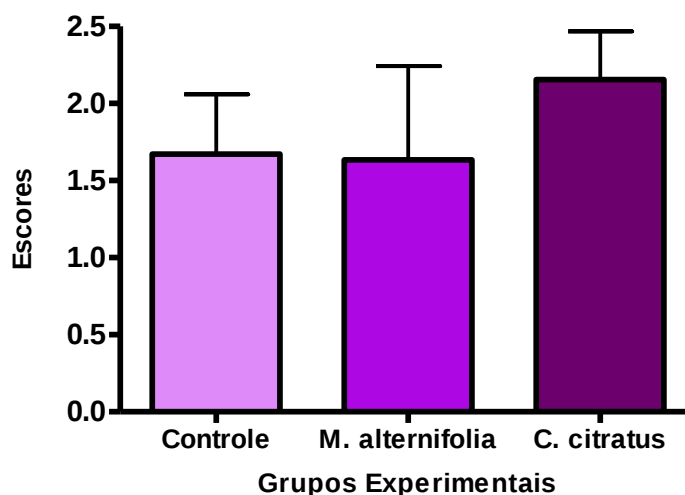


Figura 8 - Médias e Desvios-padrão da contagem de leveduras e hifas das lâminas de PAS.

Observamos na Figura 9 uma língua de camundongo normal, com aspecto saudável, apresentado papilas e sem nenhuma alteração tecidual. Na Figura 10 observamos a presença de grande quantidade de hifas e leveduras invadindo o tecido e algumas papilas danificadas.

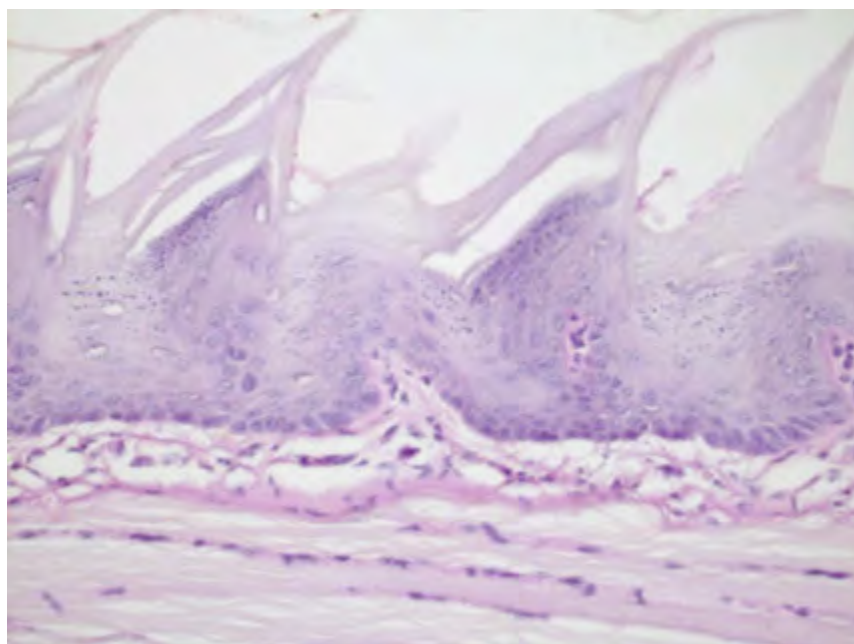


Figura 9 - Corte sagital do dorso do língua dos camundongos do grupo controle sem inoculação de *C. albicans*. PAS; aumento de 400X.

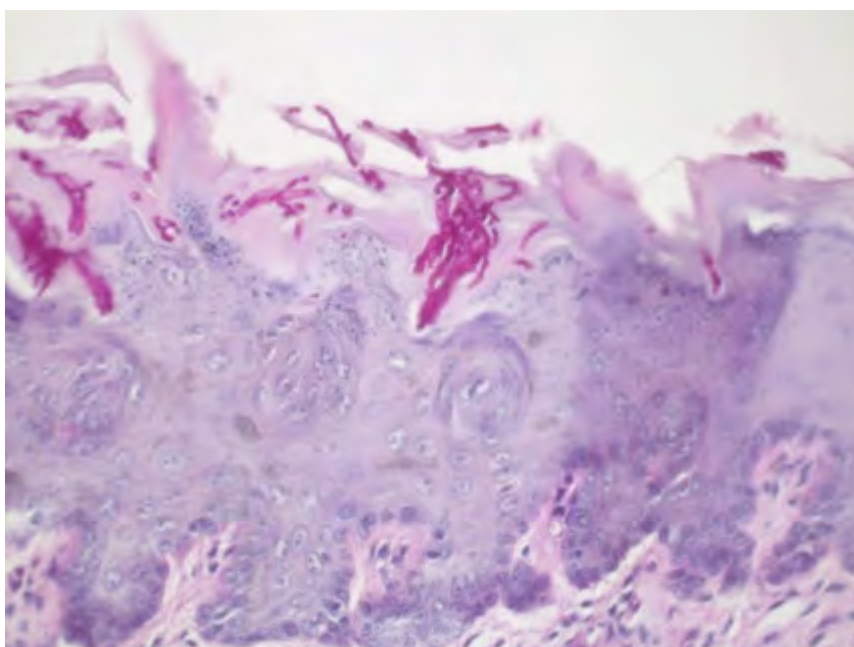


Figura 10 - Corte sagital do dorso do língua dos camundongos do grupo com inoculação de *C. albicans*. PAS; aumento de 400X.

Nas lâminas de HE foram observadas lesões teciduais de candidose, caracterizadas por alterações no tecido epitelial e infiltrado inflamatório. Essas lesões teciduais foram representadas por alterações no tecido epitelial, incluindo perda de papilas filiformes, microabscessos, exocitose, espongiose, desorganização da camada basal, hiperplasia epitelial, aumento do número de mitoses na camada basal. Foram também observadas inflamação muscular, infiltrado inflamatório e alguns vasos sanguíneos congestos na lâmina própria.

Na Figura 11 observamos uma língua normal, de aspecto saudável e sem nenhuma alteração tecidual e nas Figuras 12, 13 e 14 estão apresentadas as lesões teciduais encontradas.

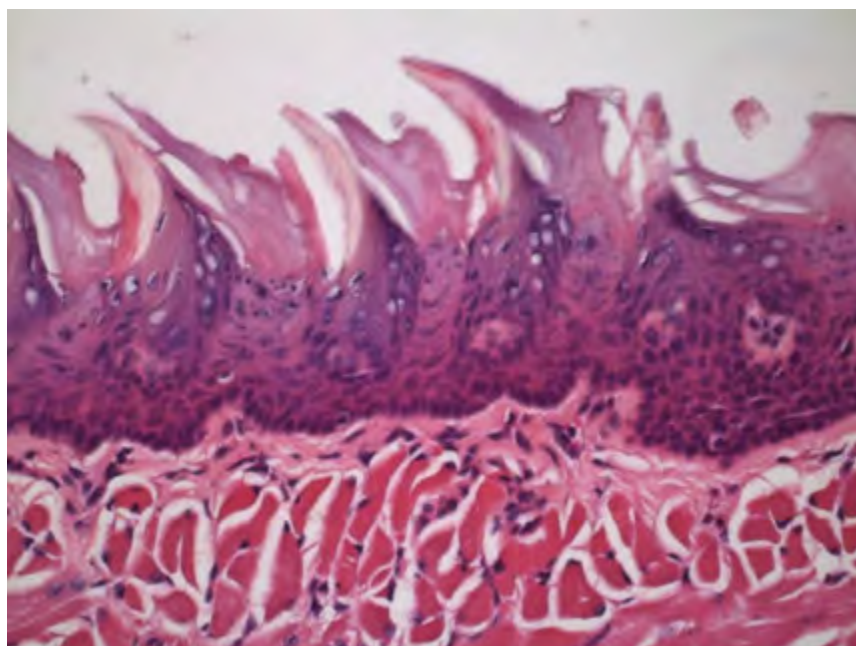


Figura 11 - Corte sagital do dorso do língua dos camundongos do grupo controle sem inoculação de *C. albicans*. HE; aumento de 400X.

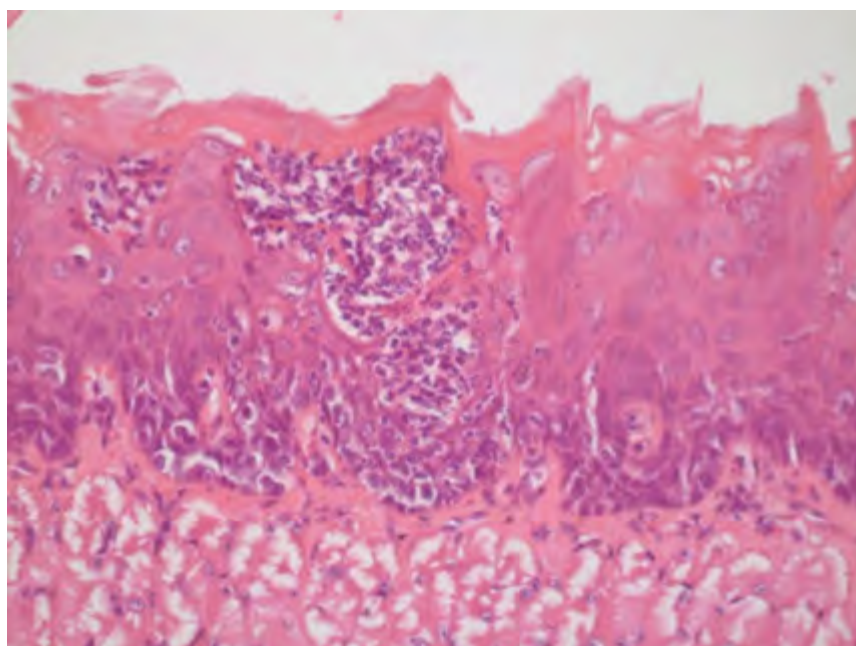


Figura 12 - Corte sagital do dorso do língua dos camundongos do grupo controle inoculado com *C. albicans*, mostrando microabscessos. HE; aumento de 400X.

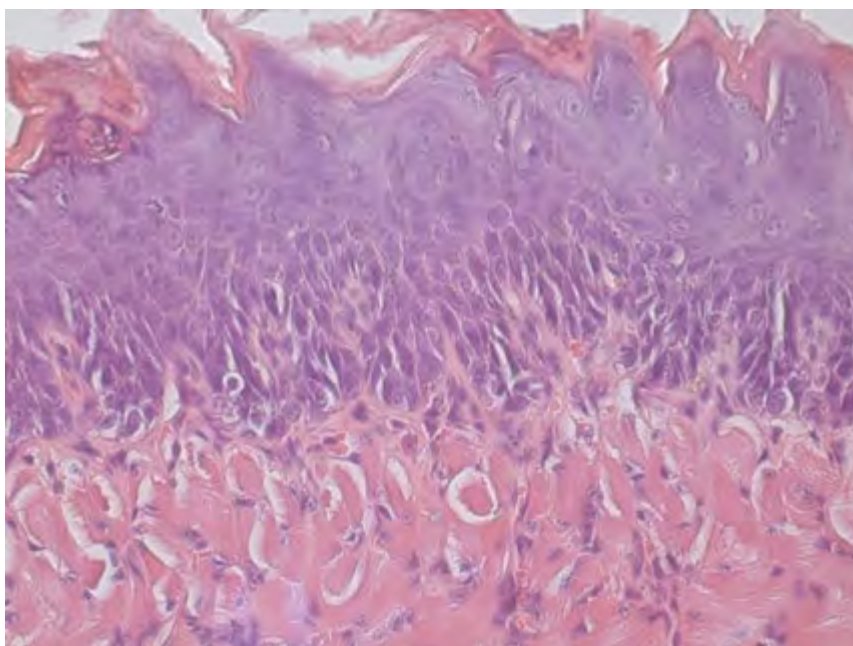


Figura 13 - Corte sagital do dorso do língua dos camundongos do grupo tratado com o óleo essencial de *M.alternifolia*, mostrando hiperplasia epitelial. HE; aumento de 400X.

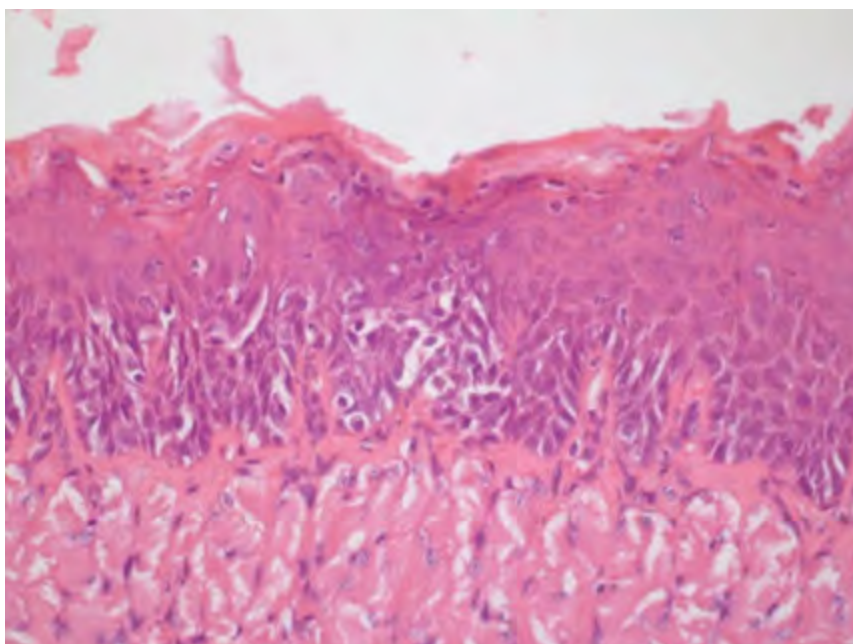


Figura 14 - Corte sagital do dorso do língua dos camundongos do grupo tratado com óleo essencial *C. citratus*, mostrando perda de papila, exocitose e espongiose. HE; aumento de 400X.

Todas estas alterações foram quantificadas e submetidas à análise estatística de Tukey, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e o grupo do óleo de *C. citratus* ($p = 0,74$), já em relação ao grupo do óleo de *M. alternifolia* houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$), conforme apresentado na Figura 15.

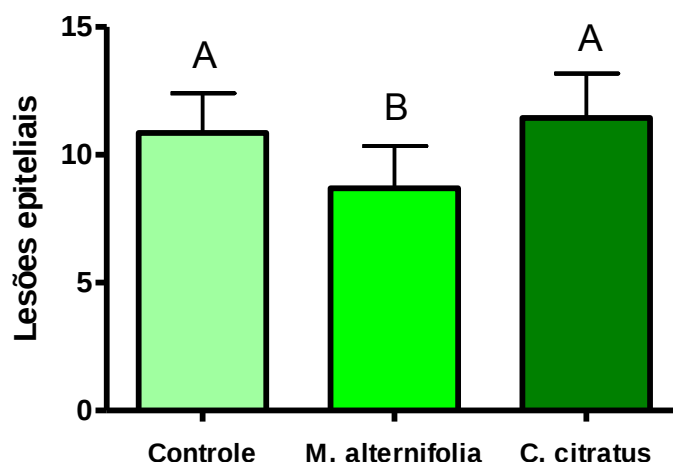


Figura 15 - Gráfico da média e desvio padrão das lesões epiteliais observadas nas lâminas de HE.

Observamos nas Figuras 16, 17 e 18 uma comparação entre os grupos *M. alternifolia*, *C. citratus* e controle, mostrando quais foram as lesões que mais se observou na língua dos camundongos. As alterações de espongiose e exocitose foram as que prevaleceram em todos os grupos experimentais, já as observadas em menores quantidades foram hiperplasia epitelial e microabscesso.

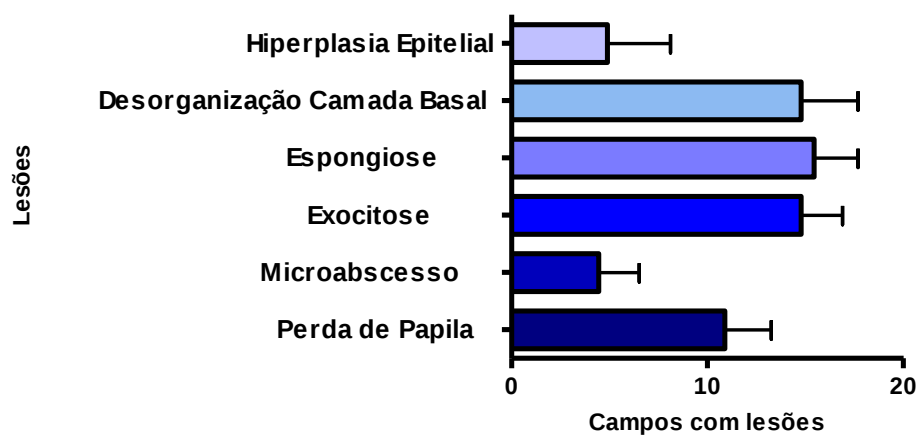


Figura 16 - Média e desvio padrão de todas as lesões epiteliais do grupo controle.

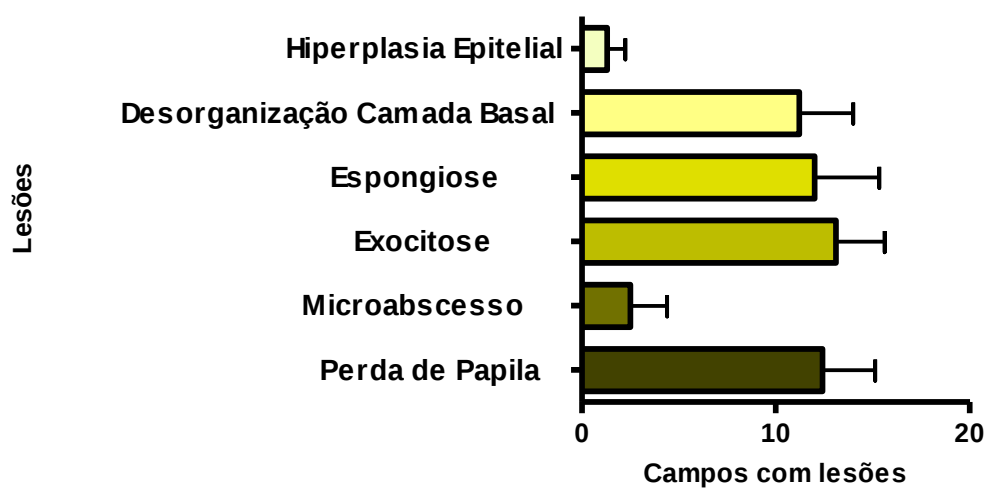


Gráfico 17 - Média e desvio padrão de todas as lesões epiteliais do grupo tratado com óleo de *M. alternifolia*.

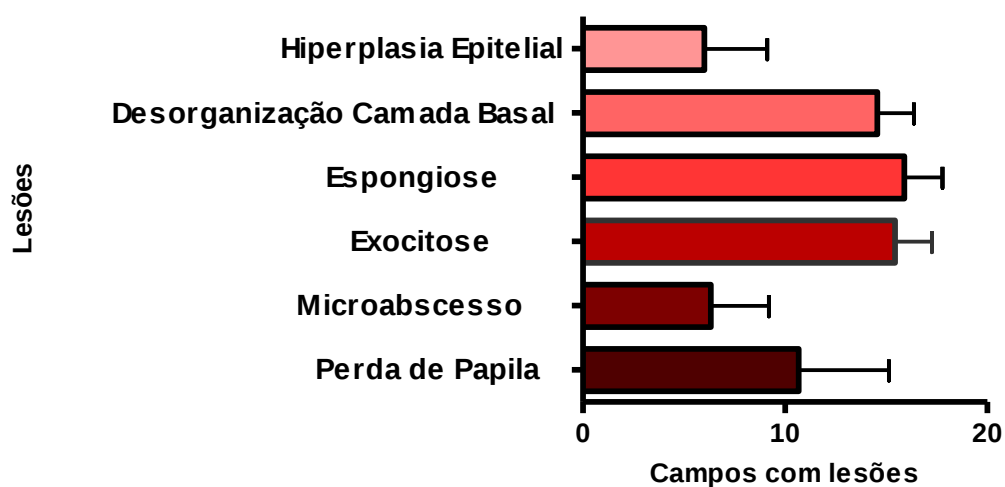


Figura 18 - Média e desvio padrão de todas as lesões epiteliais do grupo tratado com óleo essencial de *C. citratus*.

Para o infiltrado inflamatório, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais, mostrando uma diminuição do infiltrado inflamatório no grupo controle em relação aos grupos com óleo essencial (Tabela 4).

Tabela 4 - Escores médios atribuídos para análise do infiltrado inflamatório nos diferentes grupos experimentais

Animais	Controle	<i>M. alternifolia</i>	<i>C. citratus</i>
1	0,27	0,94	1,22
2	0,44	0,66	1,22
3	0,61	0,72	0,61
4	0,61	0,77	0,83
5	0,27	0,77	0,50
6	0,22	1,00	1,05
7	0,05	0,44	0,88
8	0,38	0,94	1,27
9	0,61	0,88	0,55
10	0,55	0,83	0,83
Média ± DP	0,40 ± 0,19	0,79 ± 0,16	0,89 ± 0,20

5.6 MEV da língua dos camundongos

Na análise em microscopia eletrônica de varredura, o dorso da língua apresentou grande quantidade de bactérias, hifas aderidas sobre as papilas filiformes, hifas que estavam penetrando no tecido (Figuras 19 e 20), e leveduras que se apresentavam em número reduzido (Figura 23). As papilas filiformes apresentavam-se bem danificadas em algumas regiões (Figuras 22 e 24) e em outras houve perda de papilas (Figura 21).

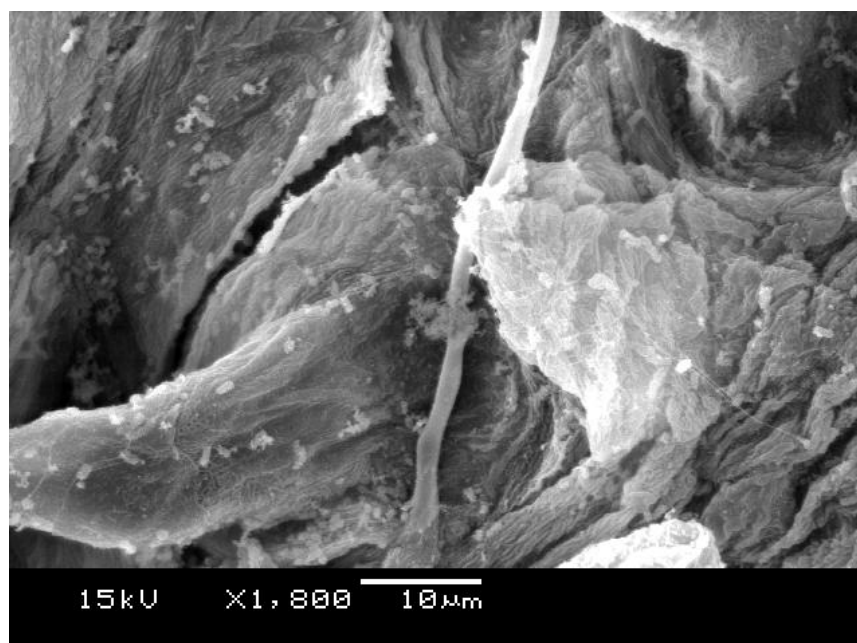


Figura 19 – MEV do dorso da língua de camundongo do grupo controle. Aumento de 1800x. Observam-se grande quantidade de bactérias aderidas as papilas e também a presença de hifa.

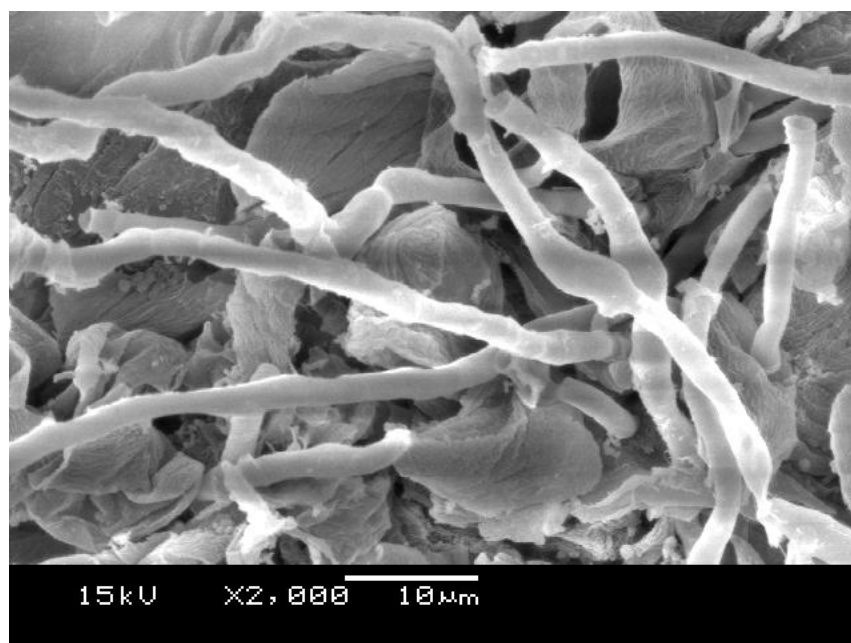


Figura 20 – MEV do dorso da língua de camundongo do grupo controle. Aumento de 2000X. Observa-se uma grande quantidade de hifas penetrando no tecido.

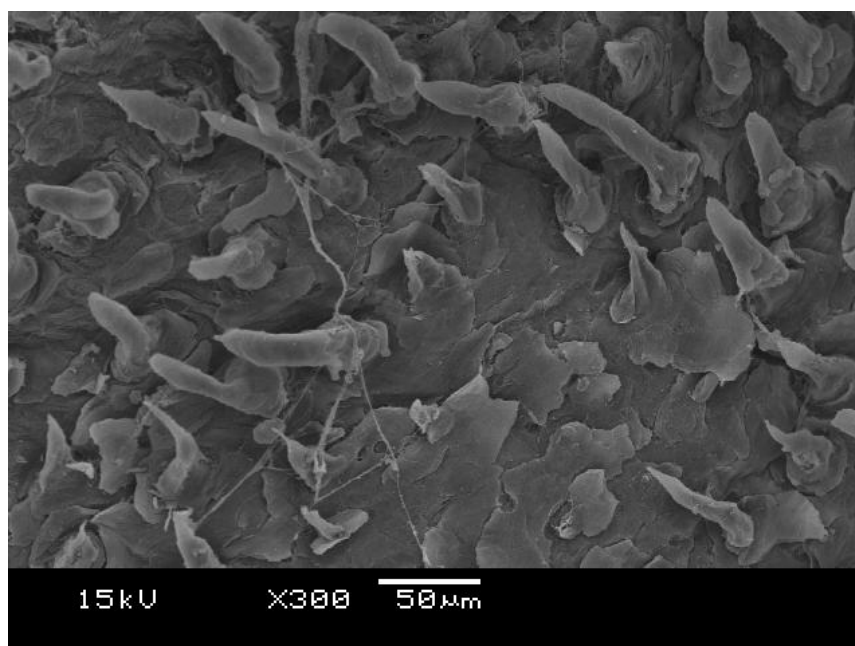


Figura 21 - MEV do dorso da língua de camundongo do grupo tratado com óleo essencial de *M. alternifolia*. Aumento de 2000X. Observam-se áreas com perda de papilas.

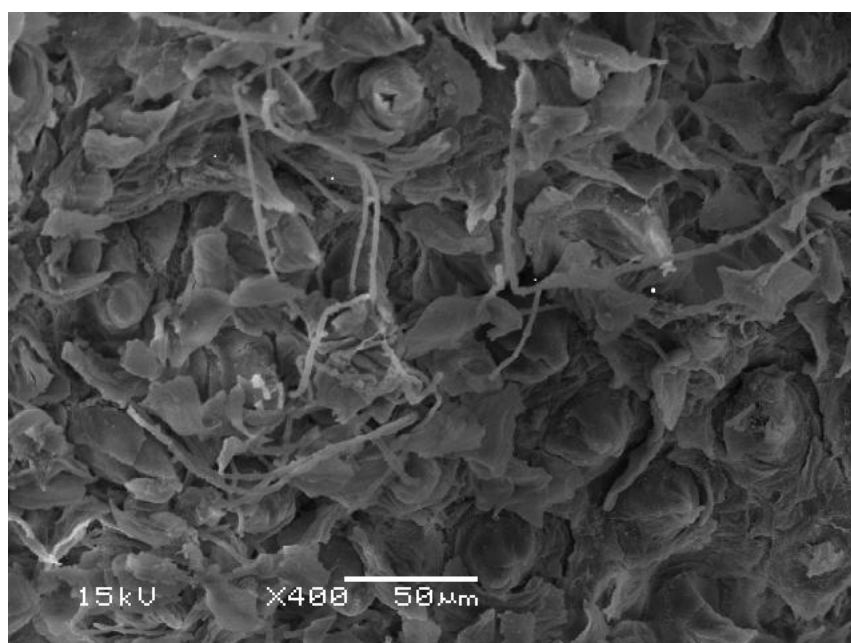


Figura 22 - MEV do dorso da língua de camundongo tratado com o óleo de *M. alternifolia*. Aumento de 400x . Observam-se hifas e algumas papilas destruídas.

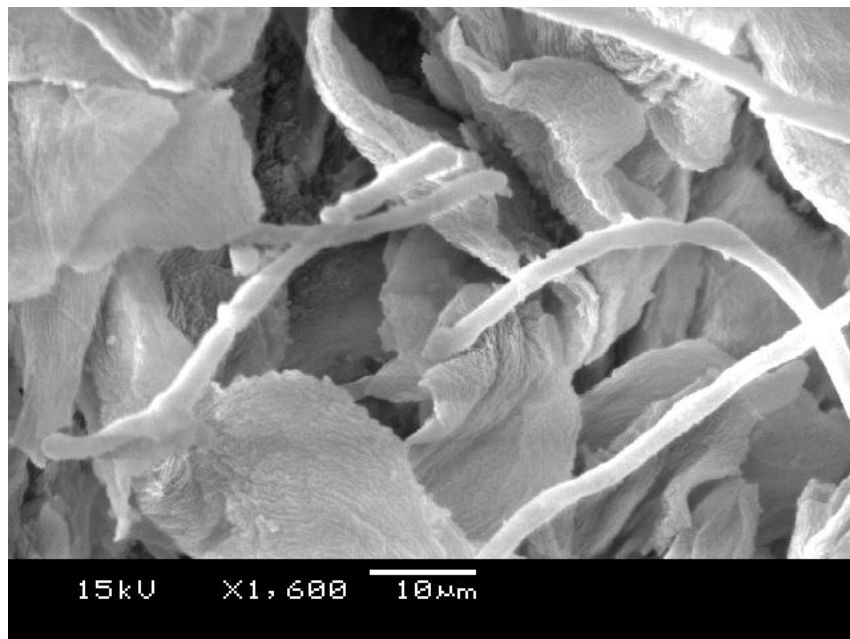


Figura 23 - MEV do dorso da língua de camundongo tratado com o óleo de *C. citratus*. Aumento de 1600x . Observam-se hifas por entre as papilas.

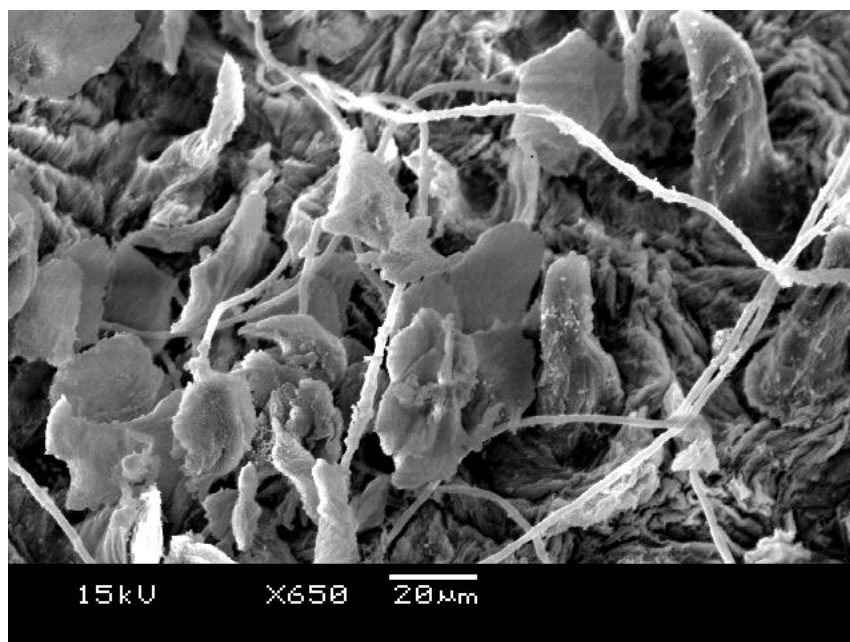


Figura 24 – MEV do dorso da língua de camundongo tratado com o óleo de *C.citratus*. Aumento de 650x. Observam-se hifas e algumas papilas destruídas.

6 DISCUSSÃO

Diversas plantas medicinais com atividades antibacterianas e antifúngicas vêm sendo estudadas com o objetivo de serem utilizadas na farmacologia para a produção de novos medicamentos com menores efeitos colaterais e menor desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos (Almeida, 2008).

Muitos extratos e óleos essenciais isolados de plantas medicinais têm demonstrado atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* (Palombo, 2009; Bakkali et al., 2007; Kim, 2005; Martinez et al., 1996; Catalán et al. 2008) e espera-se, que muitos componentes das plantas possam ser usados como medicamentos antimicrobianos sintéticos com ação sobre microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos (Duarte et al., 2005). No presente estudo, os óleos de *C. citratus* e *M. alternifolia* demonstraram atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas de *C. albicans*.

A CIM do óleo essencial de *M. alternifolia* foi de 0,195% para a cepa de *C. albicans*, concordando com trabalho de Hammer et al. (2003) e também com Altman (1989), onde os autores afirmaram que óleo de *M. alternifolia* é ativo contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, com CIM entre 0,5 e 1% para os patógenos mais comuns.

Hammer et al. (2003) investigaram a atividade fungicida dos seguintes componentes de *M. alternifolia*: terpinen-4-ol, terpineol, linalol, α -pineno e β -pineno, α -mirceno e 1,8-cineol sobre diversos fungos, entre eles *C. albicans*. Foram feitos testes de microdiluição e macrodiluição em caldo, sendo que a maioria dos componentes apresentou concentração inibitória mínima e concentração fungicida

mínima em concentrações menores que 0,25%. Somente o componente α -mirceno não demonstrou atividade fungicida contra as cepas testadas.

Noumi et al. (2010) verificaram que diversos mecanismos podem inibir a formação de micélio, que é um passo essencial para a virulência de *C. albicans*. Neste estudo, dois óleos essenciais: *Melaleuca alternifolia* e *Eucalyptus globulus* foram testados por sua capacidade de inibir o micélio formado por *C. albicans*. Os resultados obtidos mostraram que após 2 horas de incubação com o óleo essencial, cinco das dezessete cepas de *C. albicans* foram fortemente produtoras de micélio, nove amostras foram moderadamente produtoras de micélio e três isolados foram incapazes de formar hifas, sugerindo que *M. alternifolia* e *E. globulus* tiveram uma atividade antimicelial contra *C. albicans*.

No teste realizado com o óleo de *C. citratus* em culturas planctônicas, várias concentrações testadas foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*, a CIM foi menor que 0,01%. Sendo assim vários fatores podem alterar a composição dos óleos essenciais e seus resultados. As diferenças de CIM observadas podem ser atribuídas à composição química dos antimicrobianos vegetais testados, e isto tem justificativa sob vários aspectos edafoclimáticos (época de colheita, horário, localidade, entre outros fatores) que alteram a produção dos compostos ativos nas plantas. Esta afirmação encontra suporte em estudo de Gobbo-Netto e Lopes (2007), que relatam a influência dos fatores ambientais na produção dos compostos secundários das plantas, resultando em produtos vegetais com diferentes composições químicas e com isto capacidades distintas para inibição de crescimento microbiano.

Schuck et al. (2001) em testes realizados verificaram a atividade antimicrobiana de *C. citratus* e comprovaram intensa atividade antifúngica apresentada por este óleo, mostrando ter maior efetividade em relação ao antifúngico padrão (nistatina), sendo assim por apresentar ótima atividade antifúngica frente as cepas de *C. albicans*, novos medicamentos fitoterápicos poderiam ser obtidos através desse óleo.

Dutta et al. (2007) mostram em seus testes a efetividade de seis óleos essenciais: *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Callistemon lanceolatus*, *Cinnamomum camphora*, *Citrus limon*, *Tagetes petula*, onde testaram *in vitro*, através de difusão em Ágar a atividade antifúngica destes óleos e de dois antibióticos: clotrimazol e miconazol. No estudo todos os óleos essenciais testados exibiram atividade antifúngica sobre *C. albicans* maior que os dois antibióticos sintéticos testados, mostrando assim sua enorme efetividade.

O biofilme formado por *C. albicans* está associado com o aumento significativo da resistência a maioria dos antifúngicos, o que pode permitir a persistência da infecção fúngica, apesar da terapia medicamentosa. Alguns autores (Pankhurst et al., 1998; Chandra et al., 2005) sugerem que o biofilme de *C. albicans* exibe resistência à maioria dos antifúngicos, sendo considerada exceção as equinocandinas e as formulações lipídicas da anfotericina B (Pankhurst et al., 1998; Chandra et al., 2005).

Nos últimos anos tem ocorrido uma valorização crescente de que biofilmes microbianos são resistentes, o que resultou em uma série de estudos sobre doenças infecciosas a partir de uma perspectiva de biofilme. Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturados que estão ligados a uma superfície e envoltos em uma matriz. O uso de biomateriais utilizados na clínica têm mostrado colonização e formação de biofilme por *Candida* spp., e o aumento de infecções. Formação de biofilmes por *Candida* tem importante impacto clínico devido à sua maior resistência à terapia. Mais conhecimento e compreensão do papel dos biofilmes de *Candida* na infecção humana pode ajudar no tratamento clínico das infecções persistente (Ramage et al., 2006).

Devido a estes fatores de resistência e a outros, os óleos essenciais também foram testados em biofilmes, buscando novas alternativas para este problema emergente.

O óleo de *M. alternifolia* apresentou melhor eficiência, reduzindo totalmente as cepas de *C. albicans* em biofilme na concentração de 12,5%. Na literatura não foi encontrado trabalhos onde a *M. alternifolia* fosse testada sobre biofilme de *C. albicans*, foi encontrado somente teste em biofilme bacteriano, sendo que também se mostrou eficiente contra bactérias.

Filoché et al. (2005) estudaram o efeito antimicrobiano de óleos essenciais contra culturas planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus plantarum*. Os óleos essenciais testados foram: cinnamon, árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*), manuka (*Leptospermum scoparium*), *Leptospermum morrisonii*, arnica, uva e eucalipto. O óleo de cinnamon apresentou maior atividade antimicrobiana (1,25-2,5 mg/mL). Manuka, *L. morrisonii* e óleo de árvore de chá também mostraram atividade antimicrobiana, mas em menor grau. Conclui-se que pode haver um papel para os óleos essenciais no desenvolvimento de novos tratamentos anti-cárie.

Kwiecinski et al. (2009) verificaram os efeitos do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* e sobre a fase de crescimento desse microrganismo. Todas as amostras clínicas testadas foram eliminadas pelo óleo de *M. alternifolia*, tanto células planctônicas quanto biofilmes. A concentração mínima de erradicação do biofilme foi geralmente duas vezes maior que a concentração bactericida mínima, mas nunca foi superior a 1% v/v. A eliminação mais rápida de biofilme ocorreu durante os 15 primeiros minutos do primeiro contato com o óleo e não foi influenciada pelo aumento da concentração superior a 1% v/v. Células planctônicas em fase estacionária apresentaram diminuição da susceptibilidade ao óleo de *M. alternifolia* em comparação com células em fase exponencial. A taxa de eliminação de células em fase estacionária também foi menos afetada pelo aumento da concentração do óleo do que para células em fase exponencial. Esses dados mostram que o óleo de *M. alternifolia* foi

eficiente contra *S. aureus* na fase estacionária de crescimento e biofilme, sendo assim uma ferramenta promissora para erradicação de *S. aureus*.

Em relação ao uso do óleo de *C. citratus* em biofilme, demonstrou-se que o óleo apresentou menor redução em relação à *M. alternifolia*, essa pequena redução pode ter ocorrido devido à concentração usada, podendo em trabalhos futuros usar concentrações maiores. A maior ou menor atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente da composição de seus constituintes químicos como citral, pineno, cineol, furanodieno, imoneno, eugenol, eucaliptol, carvacrol e outros. Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas (Craveiro et al., 1981; Souza et al., 2005).

De acordo com Eggimann et al. 2003, a suscetibilidade de *Candida* aos antifúngicos não é uniforme, e diversos mecanismos de resistência foram relacionados: alterações na parede celular ou membrana plasmática, mutações, o sequestro do antifúngico em organela semelhante vacúolos, ou alterações cromossômicas. *Candida krusei* é resistente a alguns triazóis, e estas observações podem explicar a menor eficácia demonstrada pelo óleo *C. citratus*.

Semelhantes resultados foram encontrados por Al-Fattani em 2004, os quais testaram quatro antifúngicos (flucitosina, anfotericina B, fluconazol e voriconazol) em biofilmes multi-espécies de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *S. epidermidis* e *C. albicans*, revelando que, provavelmente, ocorra uma difusão muito lenta dessas substâncias através do biofilme, onde a presença de bactérias e matriz bacteriana pode retardar a difusão dos agentes antifúngicos, devido aos polímeros produzidos pelas bactérias e pela *Candida*, - em biofilmes mistos- podem resultar numa maior viscosidade da matriz (Al-Fattani, Douglas 2004). Esses dados indicam que a despeito do potencial antimicrobiano dessas substâncias, vários são os fatores, ainda não conhecidos, que podem

influenciar no processo de interação dessas substâncias com microrganismos, antes de exercerem sua atividade biológica complexa.

São necessários modelos animais adequados para a avaliação da etiopatologia, diagnóstico e gerenciamento do processo de doença no estudo da candidose bucal (Samaranayake; Samaranayake, 2001). O modelo animal em camundongos tem sido útil para o desenvolvimento de candidose experimental, pois o mesmo não possui *Candida albicans* como constituinte da microbiota, não apresentando resposta imune contra este microrganismo. Além disso, é facilmente obtido em grande número, apresenta sistema imune mais semelhante ao do ser humano e sua manutenção é mais barata (Samaranayake; Samaranayake, 2001; Takakura et al., 2003; Totti et al., 2002; Naglik et al., 2008). O uso de camundongos favorece a permanência de *C. albicans* na cavidade bucal em relação ao modelo de ratos, uma vez que camundongos não são portadores de leveduras do gênero *Candida* na boca (Totti et al., 2002).

Na recuperação de *C. albicans* foram realizadas coletas do dorso da língua antes e após o tratamento experimental para cálculo de UFC/mL, que ocorreu 4 dias após a inoculação de *C. albicans*. Para os animais tratados com o óleo de *M. alternifolia* ocorreu uma redução de 6,49 Log, 5,95 para os animais tratados com o óleo de *C. citratus* e para o grupo controle houve uma redução de 0,56 log. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois óleos usados. Isto demonstra que o modelo experimental para a indução de candidose foi eficiente.

Na análise macroscópica, presença de placas brancas pseudomembranosas foram observadas no dorso da língua. Takakura et al. (2003) e Mima et al. (2010) também observaram estas mesmas características em sua análise macroscópica. Na análise histológica, observou-se que leveduras e hifas de *C. albicans* estavam presentes na superfície do dorso da língua dos camundongos, não havendo diferença entre os grupos experimentais. O uso do antibiótico tetraciclina foi

importante neste resultado, pois possui atividade inibitória na microbiota bucal residente permitindo o crescimento de leveduras, sendo que na cavidade bucal há uma competição de microbiota fúngica e bacteriana, demonstrou ser uma importante ferramenta para candidose bucal (Soysa et al., 2008). Leveduras e hifas também foram observadas por, Chami et al.; 2004, Takakura et al.; 2003, Yanagi et al.; 2008 e Mima et al., 2010.

Foram também observadas alterações epiteliais e infiltrado inflamatório presentes nas lesões de candidose por *C. albicans*, estas foram quantificadas, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com óleo de *C. citratus*, já o grupo tratado com *M. alternifolia* mostrou redução das alterações epiteliais.

Taguchi et al. (2010) estudaram os efeitos de extratos de plantas medicinais sobre *C. albicans* em ensaios *in vitro* e em modelos *in vivo* de camundongos imunossuprimidos. No estudo *in vitro*, os autores observaram que os extratos de *Cymbopogon citratus*, *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Hibiscus sabdariffa*, *Camellia sinensis* e *Cinnamomum cassia* inibiram a formação de micélio por *C. albicans*. Os extratos com maior atividade antimicrobiana (*C. citratus*, *C. sinensis* e *C. cassia*) foram submetidos ao estudo *in vivo*, no qual verificou-se que a administração oral de *C. citratus* e *C. sinensis* não resultou em melhora significativa da candidose bucal experimental, enquanto que a administração de *C. cassia* diminuiu as lesões de candidose e reduziu o número de leveduras de *Candida* recuperadas da cavidade bucal dos animais.

Mondello et al. (2006) avaliaram as propriedades antifúngicas dos componentes bioativos do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, por meio de estudo *in vitro* em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, e estudo *in vivo* na candidose vaginal induzida por *C. albicans* em modelos de ratas ovariectomizadas. Os autores concluíram que o óleo essencial de

Melaleuca alternifolia apresentou atividades fungistáticas e fungicidas para todas as espécies de *Candida* estudadas. Em relação ao estudo *in vivo*, verificou-se que 3 semanas após a indução de candidose experimental, os animais tratados com óleo essencial apresentaram resolução completa do processo infeccioso, enquanto que os animais do grupo controle apresentaram persistência da infecção.

Por meio das imagens de MEV, pode-se observar uma redução de leveduras e hifas nos grupos tratados com óleos essenciais, mostrando a eficiência dos óleos testados, como alternativas promissoras para a candidose bucal. Nas imagens de MEV de biofilme, observamos redução total dos microrganismos, sendo que *M. alternifolia* foi o óleo mais eficiente. Segundo Casaroto e Lara (2010), entre as plantas medicinais com atividade antimicrobiana mais promissora, está *M. alternifolia*, apesar de muita pesquisa ainda ser necessária para seu uso clínico.

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados, concluiu-se que:

- a) as CIM dos óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* em culturas planctônicas de *C. albicans* foram respectivamente de 0,195 e menor que 0,005%;
- b) os óleos essenciais de *M. alternifolia* e *C. citratus* apresentaram atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *C. albicans*;
- c) *M. alternifolia* e *C. citratus* reduziram o número de UFC/mL de *C. albicans* recuperadas da cavidade bucal de camundongos imunossuprimidos em relação ao grupo controle;
- d) o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou lesões microscópicas de candidose menos intensas em relação ao grupo controle.

8 REFERÊNCIAS*

Aguirre Urizar JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol Bilbao. 2002;19(1):17-21.

Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. Postgrad Med. J. 2002;78(922):455-9.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3291-7.

Almeida RN, De Sousa DP, Nóbrega FFF, Claudino FS, Araújo DAM, Leite JR, et al. Anticonvulsant effect of a natural compound- α , β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. Neurosci Lett. 2008;443(1):51-5.

Altman PM. Australian tea tree oil – a natural antiseptic. Aust J Biotech. 1989;3(4):247-8.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br Dent J London. 1979;147(10):267-72.

Auler ME, Morreira D, Rodrigues FFO, Abrão MS, Margarido PFR, Matsumoto FE, et al. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. Med Mycol. 2010;48(1):211-6.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda:US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 out; citado em 03 out.] Disponível em:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.ht

Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. Arch Iran Med. 2010;13(4):282-7.

Baillie GS, Douglas J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother. 2000;46(3):397-03.

Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA et al. High prevalence of non-*albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. Palliat Med. 2003;17(6):477-81

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oil – A review. Food Chem Toxicol. 2007;46(3):446-75.

Brown AJP, Haynes K, Quinn J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. Curr Opin Microbiol. 2009;12(4):384-91.

Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Revista Ciência e Cultura. 2003;55(3):37.

Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD, Riley TV. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Antimicrob Chemother. 1995;35:421-4.

Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Netto EM. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterapicos. T&C Amazônia. 2007;11(5):26-32.

Casaroto AR, Lara VS. Phytochemicals for *Candida*-associated denture stomatitis. Fitoterapia. 2010;81(5):323-8.

Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;105(3):327-32.

Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. Oral Microbiol Immunol. 2005;20:106–11.

Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. Braz J Infect Dis. 2004;8(3):217-26.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee P K, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. J Bacteriol. 2001;183 (18): 5385-94.

Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. Curr Drug Targets. 2005;6(8):887-94.

Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW, Machado MIL. Óleos essenciais de Plantas do Nordeste. Fortaleza: Editora UFC;1981.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284(5418): 1318-22.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(5):599-607.

Cunha AP, coord. Farmacognosia e fitoquímica. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian;2009.p.10-11.

Dantas, I.C. O raizeiro e suas raízes: um novo olhar sobre o saber popular. [dissertação]. Campina Grande-PB:CCBS (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde)–UEPB(Universidade Estadual da Paraíba); 2003.

Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000;64(4): 847-67.

Donnelly RF, Mcarrin PA, Tunney MM, Woolfson AD. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(1):59-69.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93

Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19(3):139-43.

Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(2):305-11.

Dutta BK, Karmakar S, Naglot A, Aich JC, Begam M. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. *Mycoses*. 2007;50(2):121-4.

Eick S, Seltsmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria with in a single species biofilm – an *in vitro* study. *J Clin Periodontol*. 2004;31(5):376-83.

El-Aziz M, Raos S, Kanchanapoom T, Khardori N. *In vitro* activity of vancomycin, quinupristin, dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;7;4:2.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Antimycotic agents in oral candidosis: an overview: 1. Clinical variants. *Dent Update*. 2000;27:111–112

Eggimann P., Garbino J., Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003;3:685-702.

Filoché SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(4):221–5

Garozzo A, Timpanaro R, Bisignano B, Furneri PM, Bisignano G, Castro A. *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(6):806–8.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim Nova*. 2007;30(2):374-81.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(4):853-60.

Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;5(4):238-44.

Harkenthal M, Reichling J, Geiss HK, Saller R. Comparative study on the *in vitro* antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*. 1999;54(6):460-63.

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995;39:2128-131.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001;9(12):591-6.

Hulin V, Mathot AG, Mafart P, Dufossé L. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sci Aliments*. 1998;18(6):563-82.

Irkin R, Korukluoglu M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. *J Med Food*. 2009;12(1):193–197.

Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of *Melaleuca* oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS*. 1998;12(9):1033-37.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. *Oral Dis*. 2004;10(2):106-12.

Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3ªed. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2007.

Junqueira JC, Colombo CE, Martins JS, Koga Ito CY, Carvalho YR, Jorge AO. Experimental Candidosis and recovery of *Candida albicans* from the Oral Cavity of Ovariectomized Rats. *Microbiol. Immunol*. 2005;49(3):199-207.

Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):877-84.

Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J Infect Chemother*. 2004;10(4):253-5

Kim HS. Do not put too much value on conventional medicines. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(4):37-9.

Koga-Ito CY, Martins CAP, Jorge AOC. Estudo do Gênero *Candida*. In: Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Ed. Santos; 2006. Cap.15, p.219-35.

Kumamoto CA. *Candida* Biofilms. *Current Opinion in Microbiol*. 2002; 5: 608-11.

Kwiecinski J, Eickb S, Wójcika K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(4):343–47

Lacasse M. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiological and histological aspects. *J Oral Pathol Med*. 1990;19:136-41.

Leung WK, Dassanayake RS, Yau JYY, Jin LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2219-26.

Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007;86(3):204-15.

Lima EO. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, 2001.p.482-501.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(2):197-201.

Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4(6):728-35.

López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*. 2010;28(2):178–84.

Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(5):632-8

Martinez MJ, Betancourt J, Alonso-Gonzalez N, Jauregui A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 1996;52(3):171-4.

Martinez A, Regadera J, Jimenez E, Santos I, Gargallo-viola D. Antifungal efficacy of gm237354, a sordarin derivative, in experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1008-13.

Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(1):71-7.

Mantilla HJ. Cultivo ecológico de plantas medicinales y aromáticas: ampliando las perspectivas económicas em los Andes. *LEISA: Revista de Agroecología*. 2005;21(2):206-11.

March PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res*. 1992;71(7):1431-38.

McCarthy GM, Mackie ID, Koval J, Sandhu HS, Daley TD. Factors associated with increased frequency of HIV-related oral candidiasis. *J Oral Pathol Med*. 1991;20(7):332-6.

Menezes EA, Guerra ACP, Rodrigues RCB, Peixoto MMLV, Lima LS, Cunha FA. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):299-305.

Millar BC, Moore JE. Successful topical treatment of hand warts in a pediatric patient with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Complement Ther Clin Pract*. 2008;14(4):225-7.

Mima EGO, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CAS, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(3):392-401.

Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. J Glob Infect Dis. 2011;3(1):4–8.

Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. BMC Infect Dis. 2006;3;6:158.

Naglik JR, Fidel Jr PL, Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. FEMS Yeast Res. 2008;283(2):129-39.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. Approved Standard M27-A. Wayne, PA, USA: NCCLS.

Nett JE, Lepak AJ, Marchillo K, Andes DR. Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. J Infect Dis. 2009;200(2):307-13.

Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology. 2010;98(1):15–25

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiol. 2006;8(9):1382-91.

Noumi E, Snoussi M, Bakhrouf A. *In vitro* effect of *Melaleuca alternifolia* and *Eucalyptus globulus* essential oils on mycelia formation by oral *Candida albicans* strains. Afr J Microbiol Res. 2010;4(12):1332-6.

Oliveira CE. *Candida albicans* e estomatite por dentadura: Avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue. 2009. 92f. [Dissertação]–Bauru:Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo-USP;2009.

Oliveira TT. Avaliação toxicológica, caracterização de atividades biológicas, toxicologia e controle de qualidade do fitoterápico Larix Viçosa, MG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa;2002. 64p.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54(5):49-79.

Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Complement Alternat Med. 2009;(7):1-15.

Pankhurst CL, Johnson NW, Woods RG. Microbial contamination of dental unit water lines: the scientific argument. Int Dent J.1998;48(4):359-68

Pappas PJ, Kauffman CA. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009;48(5):503-35.

Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. J Antimicrob Chemother. 2008 61(1):19-30

Perussi JR. Photodynamic inactivation of microorganisms. Quim Nova. 2007;30(4):988-94.

Picazo JJ, Romo FG, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. Int J Antimicrob Agents. 2008;32(2):83–5.

Pomarico L, Cerqueira DF, Soares RMA, Souza IPR, Castro GFBA, Socransky S, et al. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV – infected children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(2):203-10.

Prakash B., Veeregowda BM., Krishnappa G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. Curr Sci. 2003;85(9):1299-1307.

Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 1998;30(2):285-93.

Queiroz FF. Estudo da cinética de extração do óleo essencial de capim-limão com dióxido de carbono líquido [dissertação]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP;1993.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(7):979-986.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003;11(2):94-100.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol.* 2009;49:39-59.

Samaranayake YU, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):398-429.

Senatore F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). *J Agr Food Chem.* 1996;44:1327-1332.

Schuck VJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Braz J Pharm Sci.* 2001;37(1):45-9.

Schwartz A, Duttke C, Hild J, Muller HJ. In vitro activity of essential oils on microorganisms isolated from vaginal infections. *Int J Aromather.* 2006;16:169-74.

Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*. 1994;18;269(11):8022-8.

Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(1):63-6.

Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis. In: Simões CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora UFRGS, Editora UFSC;2003.p.467-95.

Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48:245-50.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobial as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. *Oral Dis*. 2008;14(2):138-43.

Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand* Stockholm. 1990;48(1):3-10.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-8.

Taguchi Y, Takizawa T, Ishibashi H, Sagawa T, Arai R, Inoue S, et al. Therapeutic effects on murine oral candidiasis by oral administration of cassia (*Cinnamomum cassia*) preparation. *Jpn. J Med Mycol*. 2010;51(1):13-21.

Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003;47(5):321-6.

Teske M, Trentini AM. *Herbarium: Compêndio de Fitoterapia*. 2 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico;1995.

Totti MAG. Candidose experimental e recuperação de *Candida albicans* na cavidade bucal de camundongos normais xerostômicos [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 1998.

Totti MAG, Santos EB, Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Implantation and permanency of *Candida albicans* in the oral cavity of normal sialodenectomized mice after a single inoculation of yeast. Braz J Oral Sci. 2002;1(3):133-6

Tullio V, Nostro A, Mandras N, Dugo P, Banche G, Cannatelli MA. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. J Appl Microbiol. 2007;102:1544–50.

Trudel L, St-Amand L, Bareil M, Cardinal P, Lavoie MC. Bacteriology of oral cavity of BALB/c mice. Can J Microbiol. 1986;32(8):673-78.

Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free *Melaleuca* oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. HIV Clin Trials 2002;3(4):379–385

Vieira TR. Anatomia foliar de espécies do gênero *Melaleuca* L. e caracterização da composição química de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) [dissertação] Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (MG);2002.

Vieira PC. Estratégias para o isolamento de princípios ativos de plantas. In: Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 7. ed., Campinas, 2005. Livro de Resumos e Programação. Campinas: CPQBA-UNICAMP;2005.

Viuda-Martos M, Najavas YR, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. J Food Safety. 2007;27:91–101.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998;43(1):45-50.

Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol. 2008;85(1):11–9.

Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R, et al. Identifying infection associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. FEMS Yeast Res. 2009: 1-13.

Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. J Oral Pathol Med. 1993;22(8):354-7.

Wright SC, Maree JE, Sibanyoni M. Treatment of oral thrust in HIV/AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet. Phytomedicine. 2009;16:118-124.

Woollard AC, Tatham KC, Barker S. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. J Wound Care. 2007;16(6):255-7.

Yanagi M, Hisajima T, Ishibashi H, Amemiya H, Abe S, Watanabe M. Oral candidiasis deteriorated by local application of a glucocorticoid-containing film in a mouse model. Biol Pharm Bull. 2008;31(2):278-83.

Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with light-emitting diode. Eur J Oral Sci. 2006;114(1):64-9.

ANEXO A - Certificado do comitê de ética em pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Diniz
CEP 12281-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / nie@fod.usjc.usp.br / Gmedec@fod.usjc.usp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 024/2009-PA/CEP, sobre “Efeito do *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Cândida albicans* – Estudo *in vitro* e *in vivo*” sob responsabilidade de **VANESSA MARIA DE CAMPOS RASTEIRO**, tendo como orientadora a Profa.Dra. JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 23 de setembro de 2009



Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

