

MARTA MAJEWSKI

**AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO
PERACÉTICO E EXTRATO DE *Camellia sinensis* (CHÁ
VERDE) EM *Candida* spp.**



2011

MARTA MAJEWSKI

**AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO
PERACÉTICO E EXTRATO DE *Camellia sinensis* (CHÁ
VERDE) EM *Candida* spp.**

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

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge

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.

M288a Majewski, Marta.
Avaliação antifúngica e citotoxicidade do ácido peracético e extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) em *Candida* spp. / Marta Majewski. - São José dos Campos: [s.n.], 2011.

75.f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Prof. Antonio Olavo Cardoso Jorge.

1. Ácido peracético. 2. Desinfecção. 3. Fitoterápicos . 4. *Candida* spp I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso. 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

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, / /

Assinatura:

Email: marta_biologa@ig.com.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos /
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra Luana Marotta Reis Vasconcelos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos /
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra Thaís Cachulé Paradella

Profa. Dra Célia Regina Gonçalves e Silva

Universidade de Taubaté-UNITAU

Profa. Dra Graziella Nuemberg Back Brito

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos /

UNESP-Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 12 de Julho, 2011.

DEDICATÓRIA

Agradeço à Deus por esse feito tão grande em minha vida,
certamente não serei a mesma depois de tanta luta. Que esse
trabalho seja para honra, louvor e glória ao Seu nome.

AMÉM

À Nossa Senhora mãe afável, bondosa e compreensiva, sempre nos
acolhe com seus olhos meigos, seu perfume de rosas, seu silêncio
suave

Dedico minha Tese de doutorado à memória de Marie Curie,
primeira mulher pesquisadora a ganhar Prêmio Nobel

À minha mãe Maria Kunzler Nicolini, por suas orações e lágrimas.
Obrigada mãe por me fazer entender o que realmente importa
Quisera eu ter um grama de tua força, dignidade e coragem

TE AMO MÃE

À minha irmã Giovana, minha melhor amiga, sempre ao meu lado,
em todas as horas. Exemplo de luta, de mulher, de mãe e
companheira. Foi muita sorte nascer sua irmã, não poderia ter sido
melhor

TE AMO JÔ

Aos meus filhos vida da minha vida, carne da minha carne.

Tudo feito por vocês

Stefânia, Marcelo, Anna e Ryszard (*SMAR*)

todo meu amor, carinho, fidelidade, compreensão, amizade,
cumplicidade, respeito e caridade
AMOR ETERNO

"QUEM ENCONTRA UM AMIGO ENCONTRA UM TESOURO
Tive a sorte de encontrar dois...

Rosilene Batista de Aguiar
Rose você foi mais que amiga, foi um anjo que Deus me presenteou
Muito obrigada por tudo, por tanta amizade, tanta sinceridade
Esse trabalho é pra você
Amizade eterna

Jônatas Rafael de Oliveira
Pouco convivemos, mas foi suficiente pra perceber
a sua inteligência, caráter e bondade
Não sei o que faria sem tua amizade
Meu agradecimento eterno
Por tudo
Por todas as horas de dificuldades
Sempre comigo Amigo querido obrigada

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

pela amizade, por sua compreensão com meus momentos de dificuldades, por me aceitar com minha ignorância, sempre acreditando no potencial dos seus orientandos.

Ter sido sua orientanda foi mais que simplesmente fazer uma tese, foi aprender como se ensina, orienta e ampara.

Obrigada por sua amizade, toda minha gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor Prof. Dr. 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 Ito e Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal em especial a Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, por sempre se disponibilizar sua ajuda me acolhendo como amiga.

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

À Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos, pela disponibilidade e participação na banca examinadora do Exame Geral de Qualificação.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado e Erena Michie Hasegawa e Bruno Tanaka pela ajuda e informações dispensadas.

Às bibliotecárias Silvana Alvarez e Neide do Nascimento, pela disponibilidade em atender sempre que necessário.

Ao Dr Jamal, médico infectologista do hospital Emílio Ribas e à biomédica Simone, por disponibilizar as coletas de saliva dos pacientes HIV-positivos.

Ao Prof. Ivan Balducci, por sua generosidade nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, por sua amizade e incentivo.

À aluna de doutorado Polyana, pela ajuda no experimento com as células, toda minha amizade.

Ao aluno de doutorado Bruno Matos, por me ajudar no experimento com os antifúngicos.

Aos alunos de Iniciação científica Rodnei, Júnia e Fernanda pela amizade e carinho.

À Fernanda aluna de Pós-doc por seu acolhimento, ajuda e orações, todo o meu carinho

Aos meus colegas de laboratório, Simone, Vanessa, Carolina, Ana Karina, especialmente Guilherme Teodoro, pela convivência amigável e fraterna.

Aos funcionários do laboratório Ana Paula, Sérgio Alves e Domingos, por ter me ajudado no dia a dia.

À professora Janete e a todos os membros do Comitê de Ética, por me aceitar e acolher como membro participante.

Agradeço especialmente ao Dr Gustavo Giovannetti (psiquiatra) e à Beatriz Helena Teixeira de Moraes (terapeuta) que tanto se empenharam em me ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço de coração a todos que de alguma forma rezaram ou contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

*Solidão não é a falta de gente para conversar,
namorar, passear... Isto é carência.*

*Solidão não é o sentimento que experimentamos
pela ausência de entes queridos que não podem
mais voltar... Isto é saudade.*

*Solidão não é o retiro voluntário que a gente se
impõe, às vezes, para realinhar os
pensamentos... Isto é equilíbrio.*

*Solidão não é o claustro involuntário que o destino
nos impõe compulsoriamente para que revejamos a
nossa vida. .. Isto é um princípio da natureza.*

*Solidão não é o vazio de gente ao nosso lado...
Isto é circunstância.*

Solidão é muito mais do que isto.

Solidão é quando nos perdemos de nós mesmos e

procuramos em vão pela nossa alma....

Francisco Buarque de Holanda

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Identificação dos isolados de <i>Candida</i> spp.	32
4.1.1 Tubo germinativo	32
4.1.2 Microcultivo	32
4.1.3 Identificação bioquímica dos isolados	33
4.2 Extrato vegetal de <i>Camellia sinensis</i> (chá verde) e ácido peracético	34
4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)	34
4.3 Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos	36
4.4 Ação antimicrobiana do extrato de <i>Camellia sinensis</i> e do ácido peracético em biofilme	38
4.5 Avaliação da citotoxicidade do extrato de chá verde e ácido peracético	40
4.6 Análise estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato de <i>Camellia sinensis</i>	42
5.2 Ação antimicrobiana do extrato de <i>Camellia sinensis</i> (chá verde) em biofilme de <i>Candida</i> spp.	45
5.3 Citotoxicidade do extrato de <i>Camellia sinensis</i> (chá verde)	47
5.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do ácido peracético	48
5.5 Ação antimicrobiana do ácido peracético em biofilme de <i>Candida</i> spp.	49
5.6 Citotoxicidade do ácido peracético	51

5.7 Sensibilidade aos antifúngicos	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	65
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO	75

Majewski M. Avaliação antifúngica e citotoxicidade do ácido peracético e extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) em *Candida* spp. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP-Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antifúngica e a citotoxicidade do ácido peracético e extrato vegetal de *Camellia sinensis* a

(chá verde) e também avaliar o efeito antifúngico da anfotericina B e fluconazol em 22 cepas de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV positivos. Para determinação da concentração fungicida mínima e concentração inibitória mínima (CFM e CIM) em células planctônicas, foram realizadas diluições seriadas do extrato e do ácido peracético em placas de 96 poços em caldo RPMI tamponado, em suspensões padronizadas de cada cepa de *Candida* (10^6 células/mL). Após determinação da concentração do extrato e do ácido peracético no CIM e CFM, foi preparado o biofilme de cada cepa em placas de 24 poços utilizando-se corpos-de-prova de resina acrílica (n=10), as quais foi adicionado 0,1 mL da suspensão de *Candida* e 2mL caldo BHI sacarosado. As placas foram incubadas e mantidas a 37° por 5 dias. Após a incubação, os corpos-de-prova foram lavados em solução fisiológica e colocados em imersão por 5 minutos no ácido peracético ou no extrato vegetal. Os corpos-de-prova foram sonicados e realizadas diluições seriadas, 0,1 ml de cada diluição foi semeada em placas de ágar Sabouraud em duplicata e incubadas em estufa bacteriológica (37°C/48 h). Posteriormente foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se teste de Mann Whitney ($p<0,05$) para o biofilme, observação visual para CIM e CFM, Tukey e Anova para citotoxicidade. Foi avaliada a citotoxicidade do ácido peracético e extrato de chá verde em macrófagos de camundongos (RAW 264.7), para verificar a viabilidade celular dessas substâncias. Os resultados demonstraram que houve viabilidade do ácido peracético e extrato do chá verde nas células analisadas. Os antifúngicos avaliados apresentaram atividade antifúngica nas cepas estudadas, não houve resistência microbiana. O ácido peracético a 2% apresentou atividade antifúngica em biofilme na maioria das cepas estudadas. O extrato do chá verde a 20% apresentou efeito antimicrobiano em biofilme em todas as cepas. Foi concluído no presente estudo que o extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) apresentou atividade antifúngica em células planctônicas e em biofilme para todas as cepas de *Candida* avaliadas. O ácido peracético apresentou efeito antimicrobiano em células planctônicas e em biofilme na maioria das cepas de *Candida* estudadas. O ácido peracético e o extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) não foram citotóxicos para células de macrófagos *in vitro*. O fluconazol apresentou efeito fungistático em células planctônicas e as cepas de *Candida* avaliadas não apresentaram resistência microbiana ao mesmo. A anfotericina B apresentou efeito antifúngico nas cepas de *C. albicans* e ocorreu resistência microbiana nas cepas não *albicans*.

Palavras-chave: Ácido peracético. Desinfecção. Fitoterápicos. *Candida* spp.

Majewski M. Antifungal and cytotoxicity evaluation of peracetic acid and extract of Camellia sinensis (green tea) in Candida spp [doctorate thesis]. São José dos Campos: School Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the in vitro antifungal activity and cytotoxicity of peracetic acid and plant extract from the Camellia sinensis (green tea) and also to evaluate the antifungal effect of amphotericin B and fluconazole in 22 strains of Candida spp. isolated from the oral cavity of HIV positive patients. To determine the minimum fungicidal concentration and minimum inhibitory concentration (CFM and CIM) in planktonic cells, were performed serial dilutions of the extract and peracetic acid in 96-well plates in RPMI broth buffered in standardized suspensions of each strain of Candida (10⁶ cells / mL). After determining the concentration of the extract and peracetic acid in CIM and CFM, the biofilm was prepared for each strain in 24-well plates using body-of-proof acrylic resin (n = 10), which was added 0, 1 mL of the suspension of Candida sucrose and 2 ml BHI broth. The plates were incubated at 37 °

and maintained for 5 days. After incubation, the bodies of the test piece was washed in saline and placed for 5 minutes immersion in peracetic acid or the plant extract. The bodies of the test piece were sonicated and serial dilutions performed, 0.1 ml of each dilution was seeded on Sabouraud agar plates in duplicate and incubated in a bacteriological incubator (37 ° C/48 h). Was subsequently performed the counting of colony forming units (CFU / mL). The data were statistically analyzed using Mann Whitney test ($p < 0.05$) for the biofilm, visual observation for CIM and CFM, ANOVA and Tukey for cytotoxicity. We evaluated the cytotoxicity of peracetic acid and green tea extract in mouse macrophages (RAW 264.7) to verify the cell viability of these substances. The results showed that there was feasibility of peracetic acid and green tea extract in the cells analyzed. The antifungal agents have antifungal activity in the strains studied, there was no microbial resistance. The 2% peracetic acid showed antifungal activity in biofilm in most strains. The green tea extract 20% showed antimicrobial effect on biofilm in all strains. It was completed in this study that the extract of *Camellia sinensis* (green tea) had antifungal activity in planktonic and biofilm cells for all strains of *Candida* evaluated. The peracetic acid showed antimicrobial effect on biofilm and planktonic cells in the majority of *Candida* strains studied. The peracetic acid and the extract of *Camellia sinensis* (green tea) were not cytotoxic to macrophage cells in vitro. fluconazole had a fungistatic effect on planktonic cells and the *Candida* strains evaluated showed no microbial resistance to it. amphotericin B showed antifungal effect on strains of *C. albicans* and microbial resistance occurred in non *albicans* strains.

Keywords: Peracetic acid. Disinfection. Medicinal plants. *Candida* spp.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em pacientes imunologicamente deprimidos como pacientes portadores do vírus HIV, indivíduos transplantados, ou em tratamento quimioterápico, tanto pelo uso de imunossupressores como por fatores próprios do indivíduo, como idade avançada e doenças sistêmicas como diabetes *Mellitus*. A cavidade bucal representa um dos sítios preferenciais para o desenvolvimento de infecção por *Candida* spp. (Appleton, 2000; Samaranayake et al., 2001; Serrano-Granger et al., 2005).

A candidose orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), apresentando muitas vezes episódios recorrentes, principalmente quando a contagem dos linfócitos CD4 encontra-se baixa (Wengeter et al., 2007; Meiller et al., 2009).

Os antifúngicos utilizados no tratamento de micoses e candidoses superficiais ou invasivas são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células fúngicas. Os derivados azólicos, particularmente o fluconazol, são efetivos no tratamento de candidoses em pacientes com imunodeficiência avançada e constitui o primeiro passo para tratar essas infecções (Perea, 2002). Os poliênicos como a anfotericina B são utilizados em casos graves de infecções sistêmicas, embora apresente diversas desvantagens como nefrotoxicidade e insolubilidade em água.

A suscetibilidade aos antifúngicos pode ser distinta em leveduras isoladas de um mesmo indivíduo, revelando resistência em diversos antifúngicos azóis (Nadagir et al., 2008).

Alguns autores, frente ao aumento da resistência aos antifúngicos convencionais vem buscando alternativas para tratamento das lesões de candidose bucal, como o uso de fitoterápicos entre outras terapias (Vendruscolo et al., 2005; Majewski et al., 2008).

Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela humanidade desde os tempos primórdios. O uso indiscriminado e prolongado de fármacos químicos sintéticos tem levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz (Nadagir et al., 2008; Navas et al., 2006).

A planta *Camellia sinensis* pertence à família Theaceae conhecida popularmente como chá verde ou chá da Índia. Apresenta substâncias como flavonóides e catequinas que são componentes terapêuticos potentes como antioxidante, quelante de metais e inibidores de lipoperoxidação. Extrato das folhas secas foram testadas *in vitro* com resultados promissores na atividade antifúngica e antioxidante (Balducci et al., 1999; Vendruscolo et al., 2005). Embora seja utilizado com frequência, o estudo da citotoxicidade do chá verde faz-se necessária, para melhor utilização com segurança na clínica como fitoterápico, além dos efeitos benéficos, os efeitos citotóxicos também devem ser considerados para todas as plantas, quando utilizadas com finalidade terapêutica (Vera-Cruz et al., 2010). A cafeína quando consumida em grandes quantidades pode trazer efeitos adversos como palpitações, alterações no sono, controle motor deficiente, entre outros efeitos indesejáveis observados no consumo excessivo do chá verde (Sigg-Silva et al., 2009).

As infecções da cavidade bucal provocadas por *Candida* spp. estão relacionadas com a formação de biofilme por estes microrganismos (Blankenship, Mitchell, 2006). As células que constituem o biofilme apresentam características distintas das células planctônicas como o aumento de resistência aos antifúngicos e às defesas imunológicas do hospedeiro (Duggan, Sedgley, 2007; Tsang, Mcmillan, 2007). Os biofilmes são compostos por agregação microbiana que podem se aderir à superfície dentária assim como em outros materiais restauradores e protéticos (Eike et al., 2004), por outro lado, a escolha de substâncias para desinfecção de instrumentais na clínica odontológica e alguns materiais em hospitais, como tubos de ventilação, cateteres, entre outros, deve ser criteriosa, considerando-se alguns fatores como tempo de exposição, toxicidade, custo e eficiência em eliminar microrganismos

patogênicos (Vickery et al., 2009; Chassot et al., 2006; Duggan, Sedgley, 2007). Considerando todo paciente como possível portador de alguma doença infecciosa pré-existente, o consultório odontológico e laboratório protético devem ser monitorados adaptando as normas de biossegurança no local de trabalho e utilizando substâncias eficientes no controle da infecção cruzada (Majewski et al., 2004).

Durante muitas décadas o glutaraldeído foi a substância de escolha para desinfecção terminal de instrumentais e dependendo do tempo de exposição, também para esterilização. Embora seja considerado muito eficiente, apresenta toxicidade elevada, sendo o seu uso para desinfecção terminal proibido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O ácido peracético atualmente tornou-se um possível substituto ao glutaraldeído e ao hipoclorito de sódio, entre outros desinfetantes, por apresentar vantagens em seu uso, como a baixa toxicidade, por ser viricida e esporicida e ser volátil ao meio ambiente, além de não ser corrosivo aos metais de instrumentos cirúrgicos (Silva et al., 2008). Na literatura diversos são os estudos que relatam tratamentos utilizados para o controle microbiano, como os fitoterápicos ou fármacos industrializados como os antifúngicos, do mesmo modo os processos de desinfecção e esterilização tem o mesmo objetivo, evitar a contaminação dos materiais inanimados de uso clínico médico-odontológico. Com o intuito de ampliar o conhecimento de tratamentos alternativos e controle microbiano nas candidoses e redução de biofilme o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica do ácido peracético e do extrato de chá verde e a atividade antifúngica do fluconazol e anfotericina B em leveduras isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Leveduras do gênero *Candida* são comensais da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, entretanto podem tornar-se patogênicos na presença de fatores predisponentes, como pela imunossupressão causada pelo HIV. Wingeter et al. (2007) avaliaram a prevalência de leveduras do gênero *Candida* em lavados bucais de pacientes HIV positivos e verificaram o perfil de susceptibilidade das espécies isoladas frente aos antifúngicos. Dos 100 pacientes infectados pelo HIV, 58 apresentaram-se positivos para *Candida* spp. *C. albicans* foi isolada em 93% desses pacientes, sendo que somente em 7% dos pacientes foram isoladas outras espécies de leveduras, incluindo *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Entre todas as cepas de *Candida* isoladas, 28% foram resistentes ao cetoconazol e 3% resistentes à anfotericina B.

Hamza et al. (2008) coletaram amostras de 292 pacientes infectados pelo HIV com candidose orofaríngea primária e recorrente. *C. albicans* foi a espécie mais isolada (84,5%), seguida por *C. glabrata* (6,8%) e *C. krusei* (3,4%). Não foi observada diferença significativa na distribuição das espécies entre os pacientes com candidose primária e recorrente. Entretanto, os isolados dos pacientes com candidose recorrente foram menos sensíveis aos antifúngicos azóis quando comparados aos isolados das lesões de candidose primária. Os autores sugerem que o uso prolongado dos antifúngicos poderia levar a essa resistência.

Embora, *C. albicans* seja a espécie predominante isolada das lesões de candidose, a frequência de isolamento das espécies não *albicans* está aumentando progressivamente. Nadagir et al. (2008) isolaram leveduras do gênero *Candida* de 132 pacientes e encontraram 66,66% de *C. albicans* e 33,33% de espécies não *albicans*. Entre as espécies não *albicans*, *C. dubliniensis* foi o patógeno predominante (22,48%).

Apesar de serem isoladas em menor quantidade as espécies de não *albicans* são freqüentemente isoladas de pacientes com malignidade hematológica, pacientes transplantados e portadores do vírus HIV. As espécies não *albicans* mais comuns são *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, sendo a mortalidade desses pacientes resultante da resistência microbiana aos antifúngicos comumente utilizados como fluconazol e anfotericina B (Krcmery, Barnes, 2002).

As lesões de candidose podem variar de infecções locais superficiais até graves infecções sistêmicas e potencialmente fatais. Atualmente os antifúngicos apresentam uso limitado devido a diversos fatores como baixa potência, baixa solubilidade, toxicidade e o aparecimento de cepas resistentes (White et al., 2002; Duarte et al., 2005).

De acordo com Teichert et al. (2002), aproximadamente 81% dos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) são colonizados por cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos.

A anfotericina B, um antifúngico poliênico, foi descoberto em 1953 e continua a ser o fármaco de escolha para tratar infecções sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos, seu amplo espectro de ação assegura uma eficácia clínica no tratamento de infecções fúngicas. Numerosas são as tentativas em reduzir a atividade nefrotóxica e potencializar seu uso terapêutico (Fillippin, Souza, 2006.)

Magliorati et al. (2004) isolaram diferentes amostras de *C. albicans* da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos e verificaram que 52,2% eram resistentes ao cetoconazol e 30,4% ao fluconazol.

Aquino et al (2005) avaliaram a suscetibilidade ao fluconazol de várias espécies do gênero *Candida* de pacientes com candidemia internados em unidade de terapia intensiva (UTI). Das espécies estudadas *C. krusei* e *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol, as demais espécies apresentaram suscetibilidade ao antimicrobiano, incluindo *C. albicans* que foi a espécie mais isolada.

Grande número de antifúngicos e antibacterianos são produzidos para o tratamento de doenças de origem microbiana, o uso de fitoterápicos têm se intensificado em vários países, principalmente no Brasil que possui uma flora rica e diversa. Além da crescente utilização da

fitoterapia na área médica, na odontologia verifica-se um importante avanço nos estudos com extratos e tinturas de origem vegetal. A associação de plantas medicinais a dentifrícios ou colutórios bucais tem sido proposto por várias pesquisas e muitas plantas são testadas com o objetivo de reduzir a atividade patogênica de microrganismos presentes na cavidade bucal (Menezes et al., 2007; Modesto et al., 2001; Molina et al, 2008).

Alvarenga et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais e aromáticas, entre elas *Oreganum vulgare* (orégano) e *Salvia officinalis* (sálvia). Os autores relataram que o uso de plantas com potencial terapêutico principalmente as que apresentam efeito antimicrobiano tem sido reconhecido como fator preventivo no controle de bactérias como *Streptococcus* do grupo mutans, microrganismos correlacionados com cárie dentária.

Considerando que a maioria das doenças que acometem a cavidade bucal são de origem microbiana é recomendável o uso de substâncias que tenham efeito microbicida no controle da cárie, doenças periodontais e candidoses, com menor efeito colateral possível para o paciente. Hammer et al. (2000) demonstraram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore-do-chá) foi capaz de inibir a formação de tubo germinativo por *C. albicans*, considerado importante fator de virulência dessas leveduras.

Navas et al. (2006) verificaram que o chá de *Thymus vulgaris* (tomilho) a 10% foi efetivo em inibir a aderência de *C. albicans* à superfície da resina acrílica, considerado o primeiro passo no processo de infecção.

Molina et al. (2008) avaliaram a atividade antifúngica de vários extratos vegetais como *Salvia officinalis* (sálvia), *Calendula officinalis* (calêndula), *Ricinus communis* (mamona) e também do própolis, em 20 cepas de *Candida*. Os autores relataram que o extrato aquoso de própolis apresentou atividade fungicida em todas as cepas avaliadas, o extrato glicólico de sálvia 80% e a calêndula 10%, a mamona não foi efetiva nas cepas estudadas .

Os extratos e óleos vegetais são muito estudados, levando em consideração as propriedades terapêuticas, fácil acesso e o

pouco risco de efeito colateral ao paciente (Navas et al., 2006; Hammer et al., 2000; Modesto et al., 2001).

Vendruscolo et al. (2005) avaliaram dez plantas comumente utilizadas pela comunidade da cidade de Porto Alegre como *Cymbopogon citratus* (erva cidreira), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Plectranthus barbatus* (boldo), *Citrus limon* (limão), *Foeniculum vulgare* (funcho), *Cunila microcephala* (poejo), *Achyrocline satureioides* (macela), *Citrus aurantium* (laranja), *Aloe arborescens* (babosa), *Psidium guajava* (goiabeira) e verificaram em seu estudo que os extratos vegetais são promissores quando testado *in vitro*, revelando propriedades microbidas, antioxidantes, antipiréticas e antiinflamatórias.

Dentre as espécies utilizadas com frequência o chá verde, consumido mundialmente, destaca-se como fitoterápico por suas diversas propriedades terapêuticas. De acordo com a literatura os dados farmacológicos desse vegetal está vinculado a várias substâncias encontradas nas folhas dessa planta, como cafeína, tanino, catequinas, e polifenóis, principais componentes de efeito medicinal (Miller-Hamilton, 1995). Os compostos fenólicos (catequinas, em especial, epigalotequina e epicatequina) são os principais componentes terapêuticos da planta *C. sinensis*, potentes oxidantes e inibidores da lipoperoxidação, considerados protetores dos componentes protéicos e DNA celular. Há evidências de que o chá verde possa ser utilizado na prevenção de doenças cardiovasculares ao diminuir os níveis de colesterol plasmático e também apresenta potencial anticarcinogênico e é auxiliar no tratamento de doenças crônicas como o diabetes *Mellitus* além de preservar o organismo dos radicais livres (Pereira et al., 2009)

De acordo com Silva et al. (2010) a ingestão de chás da família *Theacea* como o chá verde e preto (*Camellia sinensis*), promove um controle significativo no desenvolvimento do diabetes e suas complicações.

Embora sua atividade antimicrobiana seja discutida, alguns autores evidenciam essa propriedade encontrada no extrato do chá verde. Yam et al. (1997) relatam em seu estudo que muitas bactérias são sensíveis ao extrato do chá verde, incluindo *Staphylococcus aureus*

meticilina-resistente, microrganismo freqüentemente isolado de pacientes com infecções nosocomiais .

As propriedades terapêuticas da *Camellia sinensis* também foram avaliadas no controle da cárie dentária, pois o extrato inibiu a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície dos dentes. Estudos em modelos animais mostraram que a inibição da aderência pode prevenir o processo de infecção da cárie (Miller- Hamiton, 2001; Balbino et al., 2010).

Das infecções que ocorrem na cavidade bucal, a cárie é a mais prevalente e o biofilme na superfície dos dentes está diretamente ligado a tal patologia, geralmente formado por uma microbiota mista, incluindo *S. mutans*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*. Nakata et al. (2007) estudaram os efeitos antimicrobianos do chá verde em saliva de 40 voluntários e 1 cepa ATCC de *S. mutans*. Os autores observaram em seu estudo, que o efeito antimicrobiano foi significativo em relação ao controle positivo (amoxicilina). Relataram também que são diversos os mecanismos de ação do chá verde sob os microrganismos, como a inibição de ácidos, enzimas e polissacarídeos.

Diversas plantas apresentam atividade antifúngica em leveduras do gênero *Candida* como *Streblus asper* que inibe a aderência do fungo à resina acrílica prevenindo a estomatite protética e a *Cinnamomum zeylanicum* breyn (canela da Índia) que potencializa o efeito antifúngico da anfotericina B (Castilho et al., 2007).

Akroum et al. (2009) investigaram as propriedades do extrato metanólico e etanólico de *Camellia sinensis* em *C. albicans* e concluíram em seu estudo que o extrato metanólico apresentou atividade antifúngica mais efetiva do que o extrato etanólico nas leveduras analisadas. O extrato etanólico do chá verde foi estudado anteriormente nesta mesma espécie do gênero *Candida* por Ahmad et al. (2001) e os autores relataram que houve ação fungicida.

Sitheequ et al. (2009) avaliaram a atividade antifúngica dos polifenóis encontrados no chá verde em leveduras do gênero *Candida*. Os autores observaram uma suscetibilidade distinta em leveduras deste mesmo gênero sendo *C. glabrata* e *C. parapsilosis* mais sensíveis aos polifenóis e catequinas que *C. albicans*.

Embora os efeitos terapêuticos do chá verde sejam muito elucidados, alguns estudos apontam para seu potencial tóxico quando consumido por longa data e em grande quantidade. Assim, além dos efeitos benéficos, efeitos citotóxicos também devem ser considerados para todas as plantas, quando utilizadas com finalidade terapêutica. Vera-Cruz et al. (2010) avaliaram os efeitos do chá verde em ratos com dieta hipercalórica. Os autores observaram que houve diminuição no peso corpóreo e esteatose no fígado dos animais obesos em relação ao grupo sem tratamento. Os autores encontraram lesões no fígado dos animais tratados que poderiam estar associadas ao tratamento.

. De acordo com Saigg-Silva et al. (2009) a cafeína quando consumida em grandes quantidades pode trazer efeitos adversos como palpitações, alterações no sono, controle motor deficiente, entre outros efeitos indesejáveis observados no consumo excessivo do chá verde.

Segundo Bartels e Miller (2003) o consumo diário do chá verde pode desencadear disfunção hepática, irritação gástrica, diminuição do apetite e hiperatividade. Os autores ressaltaram a necessidade de estudos clínicos experimentais complementares para o consumo seguro deste fitoterápico.

Com o aparecimento da AIDS na década de 80, a incidência de algumas doenças como a tuberculose, e as candidoses orofaríngeas tornaram-se uma preocupação aos profissionais que estão expostos à infecção cruzada, principalmente cirurgiões dentistas. Os microrganismos apresentam-se resistentes aos métodos de controle químico e físico e aderem aos artigos médicos e odontológicos na forma de biofilme (Vickery et al., 2009; Silva et al., 2008).

O biofilme é uma agregação microbiana, uma comunidade séssil e difere das células planctônicas por ser mais resistente que as células não agregadas, sendo considerado fator de virulência microbiana e representa o tipo de crescimento predominante no desenvolvimento de infecções associados a altos níveis de resistência à antimicrobianos, às defesas imunológicas do indivíduo e aos métodos de desinfecção e esterilização (Blankenship, Mitchell, 2006).

Os microrganismos podem formar biofilme em diversos sítios na cavidade bucal, na superfície dentária, em resinas acrílicas utilizadas na confecção de aparelhos ortodônticos e próteses dentárias, também em braquetes de metal e cerâmica. Essa estrutura pode também ser formada em superfícies de materiais de uso hospitalar como cateteres, sondas e tubos de ventilação (Paranhos et al., 2004; Loukili et al., 2004; Serrano-Granger, 2005).

De acordo com Richard et al. (2005) o biofilme formado por *C. albicans* é composto por uma mistura de células, pseudohifas, incluindo matriz extracelular composta por polissacarídeos e proteínas, o que confere maior resistência aos antifúngicos.

Tsang e Mcmillan (2007) avaliaram a formação de biofilme em discos de titânio com superfícies lisas e rugosas, os autores relataram que a formação do biofilme ocorreu nas duas superfícies, entretanto a suscetibilidade à anfotericina B foi maior no biofilme formado em superfície lisa, na rugosa o biofilme mostrou-se mais resistente.

Kantorski e Pagani (2007) observaram que a rugosidade dos materiais pode influenciar no processo de aderência microbiana, sendo que a formação do biofilme é maior e mais rápida em superfícies irregulares como em resina acrílica e metal, quando passam por processo de abrasão. A escolha de substâncias químicas que façam a desinfecção de próteses utilizadas na cavidade bucal deve ser criteriosa, considerando a toxicidade e alterações dimensionais dos trabalhos protéticos assim como os efeitos deletérios nos materiais utilizados em consultório odontológico, deve-se levar em conta que substâncias como o hipoclorito embora seja eficiente também apresenta potencial citotóxico limitando seu uso na cavidade bucal.

O ácido peracético é uma substância utilizada em ambientes hospitalares e clínicas odontológicas na desinfecção de materiais e instrumentais, em substituição ao glutaraldeído e ao hipoclorito de sódio, por apresentar baixa toxicidade, não ser corrosivo e possuir atividade esporicida e viricida (Retta et al., 2008; Silva et al., 2008). Suas propriedades antimicrobianas foram descritas primeiramente em 1909, foi considerado desinfetante e esterilizante de amplo espectro de ação, pois atua em micobactérias e esporos bacterianos, sua aplicação

oferece vantagens, pois não é inativado na presença de matéria orgânica como sangue e saliva além de não possuir resíduos tóxicos. É um desinfetante de fácil aplicação e baixo custo, de modo geral dispensa enxágüe dos materiais tratados e apresenta ausência de bioacumulação e alta degradabilidade biótica e abiótica (Vickery et al., 2009; Svidzinski et, 2007; Salvia et al., 2011).

Chassot et al. (2008) estudaram a atividade antimicrobiana do ácido peracético em resina acrílica ativada quimicamente. Os espécimes foram contaminados com *Bacillus* ssp. e colocados em imersão no ácido peracético a 0,2% por 5 a 10 minutos. Os autores relataram que após a exposição não houve crescimento microbiano.

Silva et al. (2008), avaliaram o efeito do ácido peracético na aderência de *S. aureus*. Observaram em seu estudo que essa substância inibe a aderência dessa bactéria nos espécimes de aço inoxidável, quando comparado com outras substâncias como o ácido acético. O autor observou que o ácido peracético não foi deletério aos espécimes de metal.

O ácido peracético a 0,1% foi estudado por Svidzinski et al. (2007) em cepas de *S. aureus* metilicina resistentes isolados de casos de infecção hospitalar. Os autores relataram que o microrganismo em contato com ácido peracético por 5 minutos foi suscetível à substância avaliada e em contato por 10 minutos foi totalmente eliminado.

Salvia et al. (2011) avaliaram o efeito microbicida do ácido peracético a 2% em 225 cones de guta-percha contaminados com células plactônicas e observaram redução microbiana significativa das UFC/ml, *S. mutans* (p=0,001), *S. aureus* (p=0,001), *B. subtilis* (p=0,001) e *C. albicans* (p=0,0190) em relação a contagem inicial.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

a) avaliar a atividade antimicrobiana do ácido peracético em células planctônicas e biofilme formado por *Candida* spp.;

b) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) em células planctônicas e biofilme formado por *Candida* spp.;

c) avaliar a atividade antimicrobiana dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol em células planctônicas de *Candida* spp.;

d) avaliar a citotoxicidade do ácido peracético e extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) em culturas de células de macrófagos (RAW 264.7).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 22 cepas clínicas coletadas em estudo prévio, isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos, com virologia controlada. As amostras estavam armazenadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, em agar Sabouraud inclinado e mantidas sob refrigeração. As cepas foram semeadas em placas de Petri contendo CHROM-ágar *Candida* (CHROM-ágar, Paris, França) e foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias foram identificadas morfológicamente de acordo com sua coloração sendo verde sugestivo de *Candida albicans*, azul acinzentado *Candida tropicalis* e rosa *Candida krusei* (Figura 1 e 2).

Após crescimento, as colônias de *Candida* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas por 24 horas a 37 °C para serem utilizadas nos testes de identificação fenotípica.

Foram realizadas as seguintes provas de identificação fenotípica: formação de tubo germinativo, microcultivo e teste bioquímico API 20 AUX (BioMerieux Clinical Diagnostics-França). Para padronização dos ensaios foi utilizada amostra padrão de *C. albicans* (ATCC 18804).

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia-UNESP, campus São José dos Campos sob protocolo 028/2010.

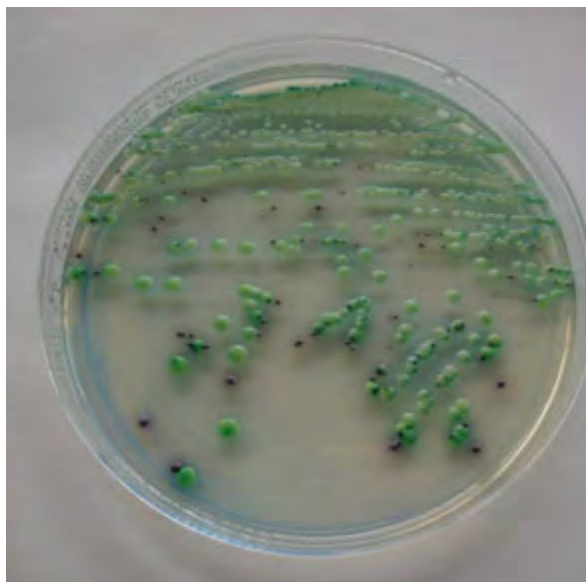


Figura 1 - Crescimento de colônias de *Candida* spp. em meio de cultura CHROM-ágar, em isolamento primário da cavidade bucal. Observa-se colônias verdes e azul acinzentado, sugestivas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente.



Figura 2 - Crescimento de colônias de *Candida* spp. em meio de cultura CHROM-ágar, em isolamento primário da cavidade bucal. Observa-se colônias verdes e brancas sugestivas de *C. albicans* e rosas *C. Krusei*.

4.1 Identificação dos isolados de *Candida* spp.

4.1.1 Tubo germinativo

Uma alçada de cultura pura de 24 horas da levedura foi adicionada em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de soro estéril de coelho. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por duas horas. A formação de tubo germinativo foi observada em microscópio de luz, colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula por período de até três horas.

4.1.2 Microcultivo

Foi utilizado o meio Corn Meal Agar (Difco, Detroit, EUA) adicionado de 1% de tween 80. Para a execução da prova, o ágar previamente fundido foi distribuído em lâminas de vidro colocadas no interior de placas de Petri esterilizadas. Após solidificação do ágar, cada cepa de levedura a ser testada foi semeada em estria única na superfície do meio e foi colocada uma lamínula no centro da lâmina. Após incubação de 48 a 72 horas à temperatura ambiente, a leitura foi feita em microscópio óptico, observando-se presença de clamidoconídeo, leveduras e hifas.

4.1.3 Identificação bioquímica dos isolados

A partir do isolamento das espécies de *Candida* obtido em CHROM-agar *Candida*, microcultivo e tubo germinativo, foi realizada a confirmação das espécies por meio de identificação bioquímica dos isolados. As colônias foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 horas a 37 °C. Para identificação bioquímica foi utilizado

o sistema de identificação API20CAUX (BioMerieux Clinical Diagnostics-França).

4.2 Extrato Vegetal de *Camellia sinensis* (chá verde) e ácido peracético

Foi utilizado extrato aquoso de chá verde (*Camellia sinensis*) na concentração de 20%, adquiridos de farmácia de manipulação (BECKER-São José dos Campos, Brasil). O extrato foi armazenado em frasco hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e em temperatura compreendida entre 8 e 12 °C até a realização dos ensaios preconizados.

Foi utilizado o ácido peracético na forma de pó (Profilática Produtos Médicos e Odontológicos, Paraná-Brasil), obtendo-se suspensão a 2% em água destilada.

4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato vegetal e do ácido peracético foi realizado o método de diluição em caldo. Diluições seriadas do extrato ou ácido peracético foram preparados em placas de 96 poços (Costar 3524), foi acrescentado 125 µL do meio sintético RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), 125 µL do extrato vegetal ou ácido peracético e 12,5 µL da suspensão padronizada (10^6 células viáveis/mL) de cada cepa de *Candida* spp. Sendo assim, foram obtidas diluições do extrato nas seguintes proporções: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, da concentração original. Após incubação por 24 horas a 37 °C, foi realizada leitura por meio de observação visual da turvação do meio.

Para o grupo controle nas placas de 96 poços (Costar 3524), foi acrescentado 125 µL do meio de cultura RPMI e 12,5 µL da suspensão padronizada (10^6 células viáveis/mL) de cada cepa de *Candida* spp. Para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), três inóculos do teste anterior, que não apresentaram crescimento em caldo, foram semeados em placas de ágar Sabouraud Dextrose, determinando a CFM como sendo a menor concentração do extrato testado capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano semeado em meio de cultura sólido.

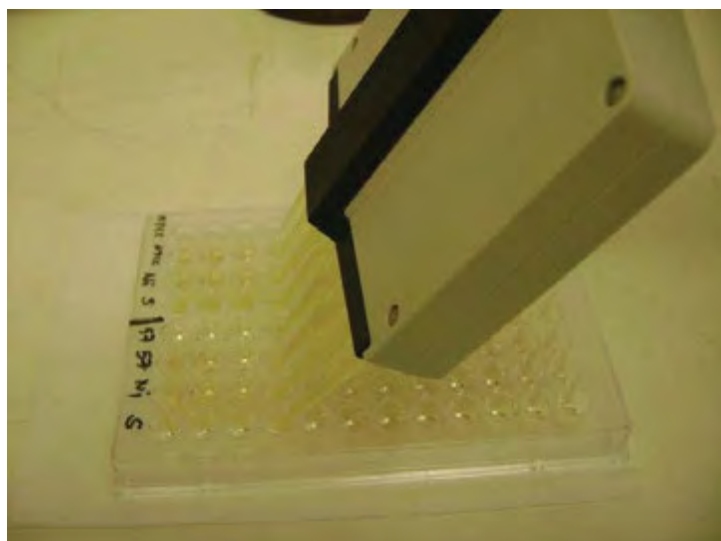


Figura 3 - Microdiluição do extrato natural de chá verde (*Camellia sinensis*) ou ácido peracético.

4.3 Sensibilidade *in vitro* de *Candida* spp. aos antifúngicos

Foram utilizados os antifúngicos anfotericina B (Sigma Companhia Química, St Louis, USA) e fluconazol (Galena Química e Farmacêutica), o tempo de leitura foi de 24 horas. As amostras de *Candida* spp. foram testadas quanto à suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos, de acordo com o método de microdiluição proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards / Clinical Laboratory Standards Institute* (NCCLS/CLSI, 2002). Para obtenção do inóculo, as amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após este período, foram obtidas suspensões padronizadas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), obtendo-se uma concentração inicial de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Posteriormente, a suspensão foi diluída em 1:2000 em meio sintético RPMI 1640 tamponado (Sigma Companhia Química, St Louis, USA) a pH 7,0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), para se obter uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL. O antifúngico

anfotericina B foi diluído em dimetil sulfóxido (DMSO), enquanto fluconazol foi diluído em água destilada esterilizada. Os antimicrobianos foram preparados nas seguintes concentrações: 320 µg/mL para anfotericina B, 1250 µg/mL para fluconazol. As soluções dos antifúngicos foram diluídas em meio sintético RPMI de forma a se obter concentrações finais de 64 a 0,03 µg/mL.

Para a realização da técnica de microdiluição foram utilizadas placas de acrílico com 96 orifícios de fundo chato e com tampa (Difco). Em cada orifício foram dispensados 100 µL da concentração do antifúngico e 100 µL do inóculo da amostra-teste. As placas foram incubadas a 37 °C e as leituras realizadas após 24 e 48 horas. As placas com anfotericina B foram cobertas com papel alumínio para proteção contra a luz.

A leitura dos resultados foi baseada em escala de turbidez visual pela turvação de um tubo controle representado por: 0 (totalmente claro); 1 (levemente turvo); 2 (turbidez intermediária) referente a 80% da redução de crescimento; 3 (turbidez proeminente) e 4 (totalmente turvo). Os resultados foram expressos como intervalos de variação entre os valores mínimos e máximos de CIM para cada amostra e também como valores de CIM 50 e CIM 90, que representam respectivamente o crescimento de 50% e 90% dos isolados. A CIM de azóis foi traduzida por aquela concentração onde ocorrer aproximadamente 80% de redução no crescimento, enquanto que para a anfotericina B, essa corresponderá àquela que representar completa ausência de crescimento (100%). Os pontos de corte considerados para a classificação dos antifúngicos testados considerados para a classificação dos isolados em suscetíveis ou resistentes seguiram os valores estabelecidos por NCCLS/CLSI (2002) NCCLS.

4.4 Ação antimicrobiana do extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) e do ácido peracético em biofilme

Para formação do biofilme, foram utilizados corpos-de-prova de resina acrílica, calotas de íris transparente com pino para confecção de prótese ocular (Clássico, São Paulo, Brasil) medindo 11 mm de diâmetro. Os corpos-de-prova receberam duas camadas de esmalte para unhas como isolante (Colorama, São Paulo, Brasil), no pino e na parte plana, com exceção da superfície convexa, e foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a temperatura de 120 °C. A seguir foram divididos em grupos (n=10).

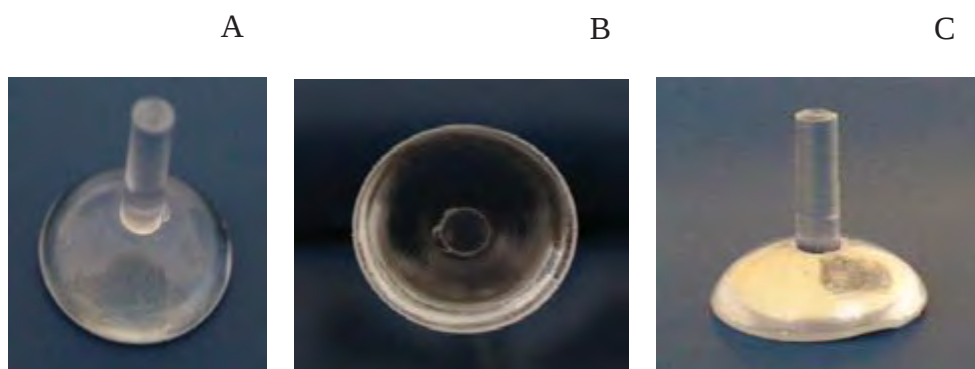


Figura 4 – Corpos-de-prova de resina utilizados para formação de biofilme. a) vista frontal, b) base corpo-de-prova e c) vista lateral.

Para a obtenção do biofilme, cada cepa foi semeada em placas de cultura contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37 °C/24 horas. Após o tempo de incubação foi preparada uma suspensão do microrganismo, em solução fisiológica esterilizada

(NaCl 0,85%) e padronizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil), para obtenção de 10^6 células/mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda foram de 0,284 e 530 nm.

Após a padronização do microrganismo, os corpos-de-prova foram colocados em placas de cultura de células de 24 poços, (TPP, Europa) e foi acrescentado 2 mL do meio de cultura caldo BHI sacarosado a 5% e 0,1 mL da suspensão do microrganismo. A placa de 24 poços foi incubada em estufa bacteriológica por 5 dias a 37 °C. Para cada experimento foram utilizados 10 corpos-de-prova que receberam tratamento com extrato vegetal ou ácido peracético, na concentração definida no CIM. Esse procedimento foi realizado para todas as cepas de *Candida*, considerando um grupo controle (n=10) para cada experimento.



Figura 5 – Corpos-de-prova em Caldo Infuso Cérebro-Coração acrescido de 5% de sacarose.

Após a formação do biofilme, os corpos-de-prova foram lavados duas vezes em solução fisiológica (NaCl 0,85%). A seguir foram colocados com auxílio de uma pinça esterilizada em solução de ácido peracético 2% (Profilática Produtos Médicos e Odontológicos, Paraná-Brasil) ou extrato vegetal a 20%. Os 10 corpos-de-prova do grupo controle que não receberam tratamento com as soluções, foram colocados em solução fisiológica a 0,85 % (NaCl) e sonicados posteriormente. O tempo de exposição adotado foi de 5 minutos para o ácido peracético e 5 minutos para o extrato vegetal. Após o tempo de tratamento os corpos-de-

prova foram lavados novamente e colocados em tubos falcon contendo solução fisiológica onde sofreram agitação por 30 segundos em sonicador 50W de potência (Sonoplus HD 2200-Bandelin Eletronic). A seguir foram realizadas diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 0,1 mL de cada diluição foram semeados em duplicata em placas de ágar Sabouraud dextrose (Difco-USA). As placas foram incubadas por 24 horas/37 °C em estufa bacteriológica. Após tempo de incubação foi realizada posteriormente a contagem de UFC/mL. As placas escolhidas para contagem foram aquelas que apresentaram entre 30 e 300 colônias viáveis de cada diluição.

O mesmo procedimento foi realizado para todas as cepas e grupo controle.

4.5 Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) e ácido peracético

Foram utilizados macrófagos de camundongos (RAW 264.7), adquiridos do Laboratório de Cultura de Células do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOSJC – UNESP, obtidas do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Companhia Química, USA), suplementado com soro fetal bovino a 10% e incubadas em estufa a temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, contendo 5% de CO₂.

O meio foi trocado a cada dois dias, sendo realizado monitoramento diário de cada frasco de cultivo celular, com auxílio de microscópio invertido (Nikon), até que seja constatado um estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, neste caso foi feito o subcultivo da monocamada de células.

Para o subcultivo, o meio do frasco foi aspirado com auxílio de uma pipeta e este foi despejado sobre a monocamada celular e depois descartado, posteriormente as células foram lavadas com meio

novo e novamente descartado. Em seguida, foi acrescentado mais meio fresco e as células foram removidas cuidadosamente do frasco com auxílio de um varredor celular (*cell scraper*, TPP). O meio fresco contendo a suspensão de células foi centrifugado, em tubo tipo falcon, a 9 mil giros durante cinco minutos, a 25 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células (*pellet*) foram ressuspensas em meio fresco e distribuídas em novos frascos de cultivo celular.

Para realização do experimento, foi realizado o mesmo procedimento para o subcultivo da linhagem celular, no entanto, após a ressuspensão das células, foi realizada a contagem de células viáveis. Para tanto, uma amostra de 50 µL foi colocada em um microtubo juntamente com 5 µL de corante azul de tripan 0,5% (Sigma, USA). Esta mistura foi agitada com uma pipeta e transferido 10 µL para a câmara de Neubauer, coberta com lamínula. Foi realizada a contagem de células viáveis sob microscopia óptica.

Foram utilizadas placas de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade. Em cada poço foi adicionado 100 µL de DMEM (LGC Biotecnologia) contendo 10^8 células. Após esse procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂, por 24 horas para que houvesse a aderência das células nos poços.

Passado o período de incubação, o meio foi retirado e acrescentado 200 µL da concentração microbicida do extrato aquoso de chá verde ou ácido peracético, obtida para todos os microrganismos testados, em meio de cultura para verificação de sua citotoxicidade. Os testes foram realizados em duplicata e o período de incubação com as substâncias foi de 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Após o tempo de incubação das placas de 96 poços contendo o extrato vegetal ou ácido peracético, o conteúdo foi descartado. Cada poço foi lavado com 200 µL solução de PBS de 3 a 5 vezes. O MTT foi preparado na proporção de 0,5 mg de pó/1 mL de PBS. A solução sofreu agitação por 10 minutos com auxílio de agitador magnético (peixe). Foi colocado 100 µL de MTT em cada poço e as placas foram enroladas em papel alumínio para evitar contato com a luz, foram incubadas por 1 hora.

Após o tempo de incubação o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de DMSO.

As placas foram incubadas por 10 minutos sob agitação por mais 10 minutos. As placas foram levadas em espectrofotômetro com DO (densidade óptica) de 570 nm.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística para o biofilme foi realizada utilizando-se teste de Mann-Whitney e para citotoxicidade ANOVA e teste de Tukey considerado-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1-Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de extrato de *Camellia sinensis* (chá verde)

Foi observado no presente estudo que o extrato de *Camellia sinensis* apresentou efeito fungicida em todas as espécies de leveduras estudadas, tanto na forma planctônica quanto em biofilme.

Apesar do extrato apresentar concentração de 20%, para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), a concentração

inicial utilizada foi 10%, considerando a diluição em caldo RPMI tamponado. Foi observado que todas as cepas avaliadas foram sensíveis ao extrato de chá verde numa concentração menor ou igual a 10%, na forma planctônica.

Os resultados obtidos no CIM e CFM demonstraram que houve variação na suscetibilidade das diferentes cepas de *C. albicans* em relação à concentração das diluições do extrato. Foi observado que o CIM apresentou variação na concentração de 1,25% a 5% e o CFM 2,5% a 10%. A partir da concentração inibitória e fungicida em células planctônicas foi determinada a concentração de 20% para avaliar os efeitos do chá verde no biofilme aderido aos corpos-de-prova. Os dados do CIM e CFM estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato de *Camellia sinensis* em células planctônicas de *C. albicans* e *Candida* não *albicans*

Microrganismo	CIM	CFM	Microrganismo	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> 17	1,25%	2,5%	<i>C. dubliniensis</i> 18s	5%	10%
<i>C. albicans</i> 4s	2,5%	5%	<i>C. glabrata</i> 45	1,25%	2,5%
<i>C. albicans</i> 52	2,5%	5%	<i>C. glabrata</i> 43	2,5%	10%
<i>C. albicans</i> 1s	2,5%	5%	<i>C. glabrata</i> 12s	5%	10%
<i>C. albicans</i> 10s	1,25%	5%	<i>C. glabrata</i> 46	2,5%	10%
<i>C. albicans</i> 24s	1,25%	2,5%	<i>C. glabrata</i> 51	2,5%	10%
<i>C. albicans</i> 31s	2,5%	5%	<i>C. glabrata</i> 67	5%	10%
<i>C. albicans</i> 39s	2,5%	10%	<i>C. krusei</i> 62	5%	10%
<i>C. albicans</i> 9	2,5%	5%	<i>C. novergensis</i> 51s	2,5%	10%
<i>C. albicans</i> 14	5%	10%	<i>C. novergensis</i> 52s	1,5%	5%
			<i>C. tropicalis</i> 11	2,5%	5%
			<i>C. tropicalis</i> 12	5%	10%

Foi observado que as cepas não *albicans* apresentaram menor suscetibilidade nas concentrações do extrato avaliado. O CIM apresentou variação de 1,25% a 10% e CFM variou de 2,5% a 10%. *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram as espécies menos suscetíveis ao extrato e houve diferença de suscetibilidade entre as espécies de *C. glabrata*.

5.2 Ação antimicrobiana do extrato de *Camelia sinensis* (chá verde) em biofilme de *Candida* spp.

Observa-se na Tabela 2 que as cepas de *C. albicans* tratadas com extrato de chá verde apresentaram redução de UFC/mL significativas em relação ao grupo controle que não recebeu tratamento, entretanto houve uma cepa (*C. albicans* 24s) que não apresentou redução significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias (UFC/mL), percentual de redução e valor de p, obtidas nas 10 cepas de *C. albicans* (n=10) tratadas com extrato de chá verde a 20%.

Espécie	Controle	Chá verde	Valor p	Redução %
<i>C. albicans</i> 17	22100	3750	0,0002	83,0
<i>C. albicans</i> 4s	54800	19400	0,0002	64,6
<i>C. albicans</i> 52	9550	4650	0,0004	51,3
<i>C. albicans</i> 1s	41300	18300	0,0004	55,7
<i>C. albicans</i> 10s	48000	22750	0,0002	52,6
<i>C. albicans</i> 24s	36000	26000	0,0754	27,7
<i>C. albicans</i> 31s	10450	3850	0,0002	63,2
<i>C. albicans</i> 39s	68300	30200	0,0008	55,8
<i>C. albicans</i> 9	37300	5400	0,0002	85,5

<i>C. albicans</i> 14	68000	32000	0,001	52,9
Média				59,2

Os resultados de redução de UFC/ml em biofilme apresentados na Tabela 2, demonstraram que o extrato do chá verde a 20% apresentou efeito fungicida nas cepas de *C. albicans* quando em biofilme. A média do percentual de redução foi de 59,2%.

Foi observado na Tabela 3 que houve diferença estatística significativa de redução UFC/mL nas cepas de *C. tropicalis* (0,0002), *C. novergensis* (0,0002) e *C. glabrata* (0,0002), as demais cepas apresentaram pouca redução em relação ao grupo controle. A cepa *C. glabrata* 45 não sofreu redução comparando com grupo sem tratamento, também *C. krusei* não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,0082$).

Tabela 3 - Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) percentual de redução e valores de p, obtidas nas 10 cepas de *C. não albicans* tratadas com extrato de chá verde a 20%.

Microorganismo	Controle	Chá verde	Valor p	Redução %
<i>C. dubliniensis</i> 18s	12150	7500	0,1859	38,2
<i>C. glabrata</i> 45	32400	18400	0,1618	43,2
<i>C. glabrata</i> 43	60400	28800	0,0002	52,3
<i>C. glabrata</i> 12s	60800	46000	0,0139	24,3
<i>C. glabrata</i> 46	51200	38000	0,0017	25,7
<i>C. glabrata</i> 51	20100	6900	0,0257	65,5
<i>C. glabrata</i> 67	60400	28800	0,0002	52,3
<i>C. krusei</i> 62	53400	48800	0,0082	8,6
<i>C. novergensis</i> 51s	52400	23600	0,0002	54,9
<i>C. novergensis</i> 52s	18550	4300	0,0002	76,8
<i>C. tropicalis</i> 11	38400	5450	0,0002	85,8
<i>C. tropicalis</i> 12	12700	5680	0,0002	55,2
Média				48,5

A média do percentual de redução de todas as cepas foi de 48,5%, esses dados demonstraram que as cepas não *albicans* foram mais resistentes em biofilme tratado com chá verde do que as cepas de

C. albicans. A diferença de redução UFC/mL entre *C. albicans* e não *albicans* foi de 10,7%.

5.3 Citotoxicidade do extrato de *Camellia sinensis* (chá verde)

Foram analisadas diversas concentrações do extrato do chá verde, 10%, 5% e 2,5%, em macrófagos de camundongos RAW (264-7). Foi observado que houve pouca diferença estatística nas médias das diferentes concentrações.

De acordo com os resultados obtidos as células submetidas ao extrato do chá verde apresentaram viabilidade em todas as concentrações analisadas. A média de viabilidade da concentração a 10% (103,91%) apresentou pouca diferença estatística em relação a média da concentração 2,5% (89,25%). Esses dados obtidos demonstram que o extrato de *Camellia sinensis* não apresentou citotoxicidade celular nas concentrações analisadas.

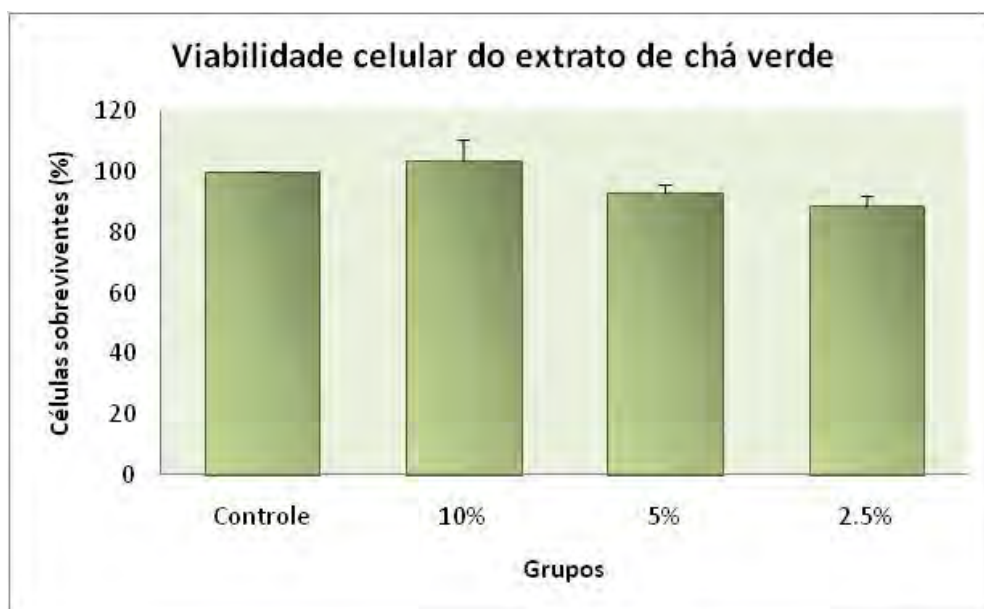


Figura 6 - Valores médios da viabilidade celular dos grupos avaliados por MTT, após exposição ao extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) nas concentrações de 2,5%, 5% e 10%.

5.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) ácido peracético

Os resultados obtidos no CIM e CFM de todas as cepas analisadas neste estudo apresentaram concentração inibitória mínima de 0,5% do ácido peracético e concentração fungicida mínima de 1%, para as cepas de *C.albicans* e não *albicans* na forma planctônica.

5.5 Ação antimicrobiana do ácido peracético em biofilme de *Candida* spp.

Pode-se observar nos resultados, que houve redução UFC/mL no biofilme formado por *C. albicans*. A média do percentual de redução foi de 63,3% para todas as cepas analisadas, entretanto uma cepa de *C. albicans* (24s) não apresentou redução significativa (20,1%), as demais cepas apresentaram uma redução distinta, variando de 27,6 a 89%.

Esses dados demonstram que cada cepa de *Candida* apresentou uma suscetibilidade diferente ao ácido peracético a 0,5% em biofilme e o percentual de redução difere entre todas as cepas estudadas.

Tabela 5 - Unidades formadoras de colônias (UFC/ml), percentual de redução e valor de p em biofilmes formados por *Candida albicans* (n=10) após tratamento com ácido peracético

Espécie	Controle	Ácido peracético	Valor p	Redução %
<i>C. albicans</i> 17	41400	4550	0,0002	89,0
<i>C. albicans</i> 4s	44500	6850	0,0002	84,6
<i>C. albicans</i> 52	44050	22000	0,0002	50,0
<i>C. albicans</i> 1s	49400	36200	0,0008	27,6
<i>C. albicans</i> 10s	19300	4150	0,0002	78,4
<i>C. albicans</i> 24s	35800	28600	0,9097	20,1
<i>C. albicans</i> 31s	45200	5000	0,0002	88,9
<i>C. albicans</i> 39s	16700	5750	0,0002	65,5
<i>C. albicans</i> 9	31000	5350	0,0002	82,7
<i>C. albicans</i> 14	50400	27000	0,0013	46,4
Média				63,3

Os dados obtidos nas UFC/mL demonstraram que o biofilme formado por cepas não *albicans* foi resistente ao ácido peracético a 0,5% em algumas cepas. A média do percentual de redução foi de 48,2%, para as cepas suscetíveis ao tratamento. *Candida glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* não apresentaram redução estatisticamente significativa ao ácido peracético a 0,5%. As demais cepas apresentaram redução UFC/ml significativa.

Tabela 6 - Unidades formadoras de colônias (UFC/ml), percentual de redução e valores de p, em biofilmes formados por *C. não albicans* após tratamento com ácido peracético

Microrganismo	Controle	Ácido peracético	Valor p	Redução %
<i>C. dubliniensis</i> 18s	13650	7500	0,0452	45,0
<i>C. glabrata</i> 45	35800	26700	0,0376	25,4
<i>C. glabrata</i> 43	31250	46000	0,0065	47,2
<i>C. glabrata</i> 12s	10200	29100	0,0072	*
<i>C. glabrata</i> 46	12700	36600	0,0002	*
<i>C. glabrata</i> 51	34900	46250	0,0412	35,5
<i>C. glabrata</i> 67	22000	44050	0,0010	*
<i>C. krusei</i> 62	47000	14550	0,0091	69,0
<i>C. novergensis</i> 51s	46250	34900	0,0412	24,5
<i>C. novergensis</i> 52s	47600	36200	0,0091	23,9

<i>C. tropicalis</i> 11	15400	1980	0,2897	87,1
<i>C. tropicalis</i> 12	8250	1900	0,0017	76,9
Média				48,2

*Não ocorreu redução

5.6 Citotoxicidade do Ácido peracético

Foram avaliadas duas concentrações do ácido peracético (a 1 e 2%) em macrófagos de camundongos RAW (264-7) para verificar a viabilidade. Foi observado neste estudo que a média da concentração a 2% (56,25%) apresentou pouca diferença estatística em relação a média da concentração a 1% (57,41%). O ácido peracético apresentou viabilidade celular nas concentrações avaliadas.

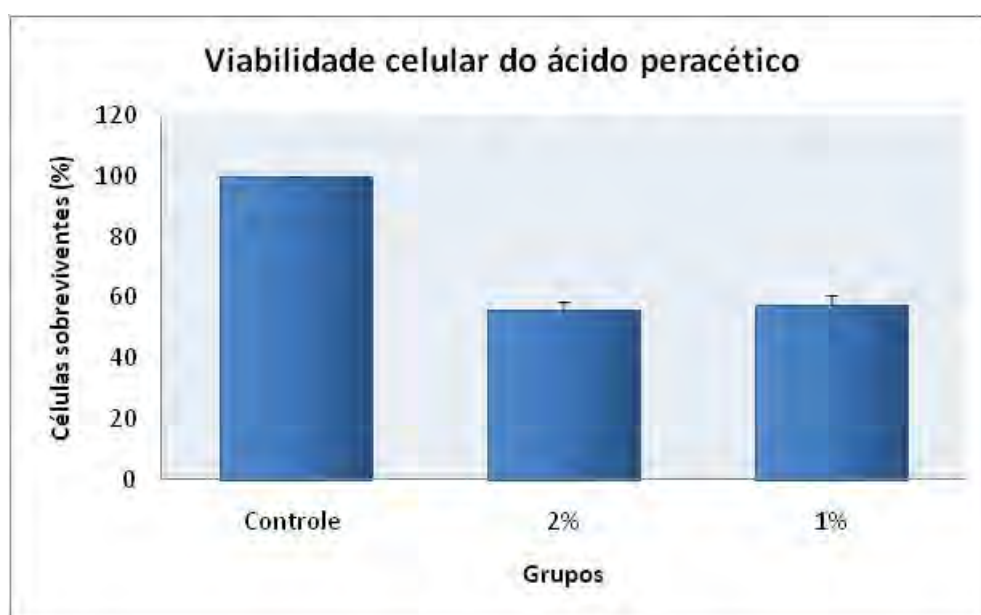


Figura 7 - Valores médios da viabilidade celular dos grupos avaliados por MTT, após exposição ao ácido peracético nas concentrações de 1 e 2%.

5.7 Sensibilidades aos antifúngicos

Foi observado no presente estudo que todas as cepas de *C. albicans* avaliadas no CIM do fluconazol apresentaram suscetibilidade nas concentrações avaliadas (0,25 a 32 µg/mL). Não houve resistência nas cepas estudadas. Os dados estão expressos na tabela 8. Os resultados obtidos no CIM do fluconazol obtido nas cepas de *Candida* não *albicans* estão expressos na tabela 8. Os valores das concentrações do antifúngico estudado variou de 0,5 a 32 µg/mL, foi observado que não houve resistência das diversas cepas e espécies de *Candida* analisadas.

As cepas de *C. albicans* foram suscetíveis à anfotericina B nas concentrações de 0,5 a 2 µg/mL, entretanto houve resistência microbiana nas concentrações de 4 a 8 µg/mL de duas cepas. Os resultados do CIM da anfotericina B demonstrou que algumas espécies não *albicans* foram resistentes ao antifúngico analisado., de todas as espécies cinco foram resistentes (4 a 8 µg/mL) a este antifúngico.

Tabela 8 - Distribuição de *Candida* spp.de acordo com o CIM do fluconazol e anfotericina B nas cepas de *C. albicans* e *Candida* não *albicans*

Concentrações dos antifúngicos Fluconazol e Anfotericina B (µg/mL)					
Microrganismo	CIM	CIM	Microrganismo	CIM	CFM
Cepa	Fluco*	Anfot*	Cepa	Fluco*	Anfot*
<i>C. albicans</i> 17	2	2	<i>C. dubliniensis</i> 18s	2	2
<i>C. albicans</i> 4s	32	8	<i>C. glabrata</i> 45	1	1
<i>C. albicans</i> 52	2	0,5	<i>C. glabrata</i> 43	1	8
<i>C. albicans</i> 1s	1	4	<i>C. glabrata</i> 12s	1	2
<i>C. albicans</i> 10s	4	0,5	<i>C. glabrata</i> 46	1	4
<i>C. albicans</i> 24s	2	2	<i>C. glabrata</i> 51	1	2
<i>C. albicans</i> 31s	0,25	2	<i>C. glabrata</i> 67	1	0,5
<i>C. albicans</i> 39s	0,25	2	<i>C. krusei</i> 62	1	4
<i>C. albicans</i> 9	4	2	<i>C. novergensis</i> 51s	0,5	2
<i>C. albicans</i> 14	2	2	<i>C. novergensis</i> 52s	0,5	2
			<i>C. tropicalis</i> 11	2	4
			<i>C. tropicalis</i> 12	32	4

Fluco* Fluconazol, Anfot* Anfotericina B

6 DISCUSSÃO

As leveduras do gênero *Candida* são fungos oportunistas responsáveis por infecções em diversos sítios do organismo, sendo a cavidade bucal o local preferencial no desenvolvimento destas doenças. Embora sejam comensais, essas leveduras podem causar doença quando na presença de um ou mais fatores predisponentes, sendo a imunossupressão fator determinante no processo de infecção (Appleton, 2000).

A candidose bucal é uma infecção localizada e em pacientes imunodeprimidos como em portadores do vírus HIV, que estejam com a doença estabelecida e que apresentem uma resposta imune deficiente, pode tornar-se sistêmica, podendo comprometer a vida do indivíduo (Hospental et al., 2006; Matsuki et al., 2006)..

Diversos estudos demonstraram que o patógeno mais frequentemente isolado de lesões bucais é *C. albicans* e corresponde a 45% dos achados em pacientes nosocomiais, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos imunodeprimidos ou que fazem uso de corticóides (Aquino et al., 2005).

A proporção de candidemias por espécies não *albicans* à partir da década de 80 aumentou de 10 a 40%, em contraste nos anos de 1991 a 1998, houve aumento significativo de 20 a 40% de todas as candidemias sendo *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* as espécies mais isoladas e foram consideradas emergentes nesta década (Kcromery, Barnes, 2002).

De todas as espécies analisadas neste trabalho *C. glabrata* foi a mais prevalente de todas as não *albicans*, totalizando 80% dos isolados estudados. As infecções por *C. glabrata* são associadas com freqüência em pacientes HIV-positivos e não leucêmicos e as infecções causadas por *C. albicans* afetam mais indivíduos leucêmicos ou com tumores sólidos e outras malignidades hematológicas (Samaranayake et al., 2001; Kcromery, Barnes, 2002).

No presente estudo foram analisadas 22 cepas isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos obtidas de estudo prévio. Essas cepas foram inicialmente identificadas morfológicamente em meio

cromogênico CHROM-ágar *Candida* que identifica presuntivamente as espécies pela coloração das colônias. Foram encontradas colônias verdes, sugestivas de *C. albicans*, rosa *C. krusei*, azul acinzentado *C. tropicalis* e colônias brancas. Foram identificadas 10 espécies de *C. albicans* e 12 espécies não *albicans*, dentre estas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. novergensis*. A confirmação das espécies foi realizada por meio do sistema bioquímico de identificação API 20AUX, confirmando os dados obtidos com o meio cromogênico. Foi encontrado neste estudo, portanto, um número proporcional entre as espécies, incluindo *C. dubliniensis*, patógeno fenotipicamente similar à *C. albicans* e *C. novergensis*, leveduras consideradas emergentes em pacientes HIV-positivos. Esses dados estão de acordo com diversos estudos encontrados na literatura, que consideram outras espécies do gênero *Candida* como integrantes no processo de infecção da cavidade bucal sendo os isolados não *albicans* equiparado em número à espécie predominante (Pfaller et al., 1996; White et al., 2002; Panackal et al., 2006; Shivaprakasha et al., 2007; Coco et al., 2008).

As afecções odontológicas podem ter diversas etiologias, mas em sua grande maioria o agente causador é de origem microbiana. Algumas patologias da cavidade bucal têm sido tratadas com fitoterapia, empregadas como terapia coadjuvante aos tratamentos convencionais. As plantas têm sido desde a antiguidade um recurso ao alcance do ser humano e com base no uso e conhecimento popular, o crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos estimularam a avaliação de diferentes extratos de plantas para o controle de biofilme dentário e outras doenças da cavidade bucal, bem como as candidoses (Oliveira et al., 2007). Algumas plantas como *Malva sylvestris* (malva), *Salvia officinallis* (sálvia) e *Punica granatum* (romã) são empregadas para diminuir processos infecciosos e inflamatórios na cavidade bucal como a cárie, a gengivite, abscessos e candidoses. Resinas como o própolis e especiarias como o *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) e *Thymus vulgaris* (tomilho) são também considerados efetivos no tratamento dessas infecções (Molina et al, 2008; Navas et al, 2008).

Camellia sinensis, conhecida popularmente como chá verde, é uma planta de origem asiática, atualmente também cultivada em outros países, inclusive no Brasil. É consumida mundialmente por ser uma bebida agradável e apresentar propriedades curativas intrínsecas e peculiares. Essa planta apresenta potencial terapêutico, por apresentar em sua composição química substâncias como flavonóides e catequinas, entre outras.

A atividade antimicrobiana do chá verde já foi anteriormente estudada e de acordo com esses estudos além de todos os benefícios encontrados nessa planta o efeito microbicida também é considerável (Hamilton-Miller, 1995; Yam et al. 1997). Em nosso trabalho o objetivo foi avaliar efeito fungicida do chá verde a 20%, entretanto para os ensaios da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima, o extrato foi diluído em meio de cultura RPMI na proporção de 50%, atingindo uma concentração de 10% que foi analisada em cepas clínicas de *C. albicans* e *C. não albicans* na forma planctônica. Os resultados demonstraram que todas as cepas de *C. albicans* foram suscetíveis ao extrato de chá verde, embora tenham apresentado padrão de suscetibilidade diferenciado para o CIM (1,25% a 5%) e no CFM (2,5% a 10%). Observou-se que as cepas não *albicans* foram mais resistentes ao extrato do chá verde do que *C. albicans*, ocorrendo também variação nas concentrações do CIM (1,25 a 10%) e CFM (2,5% a 10%), as espécies que apresentaram maior resistência foram *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Michelin et al. (2005) avaliaram a concentração inibitória mínima de vários extratos vegetais como *Artemisia absintium* (losna), *Mentha pulegium* (poejo), *Punica granatum* (romã), *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) e *Syzygium cumini* (jambolão) na concentração de 200 mg/mL em microrganismos resistentes aos antimicrobianos como *S. aureus* e *C. albicans*. Os autores observaram que foi encontrado efeito inibitório dos extratos em bactérias, entretanto as leveduras mostraram-se resistentes.

Alves et al. (2006) estudaram a atividade antifúngica do extrato de *Pisidium guajava* (goiabeira) em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* e *C. krusei* isoladas da cavidade bucal. Os autores

compararam o extrato vegetal com gluconato de clorexidina a 0,12% e observaram que todas as espécies foram sensíveis ao extrato analisado comparando ao controle positivo.

No presente estudo foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida (CFM) do ácido peracético a 1% em todas as cepas na forma planctônica. O ácido peracético atingiu uma concentração de 1% quando diluído ao meio RPMI em cada poço da placa de 96 poços. A concentração inibitória mínima de todas as cepas foi de 0,5% e a concentração fungicida mínima foi obtida com ácido peracético a 1%. Não houve diferença de suscetibilidade entre as espécies de *C. albicans* e não *albicans*, sendo obtido mesmo padrão de suscetibilidade em todas as espécies analisadas.

Os microrganismos quando na forma planctônica são menos resistentes aos processos químicos e físicos de desinfecção e mais suscetíveis aos antimicrobianos do que na forma de biofilme. Os biofilmes são considerados uma forma de virulência e resistência microbiana. São formados quando uma comunidade microbiana se adere e instala em uma superfície, passo importante no processo de infecção, são mais resistentes aos fármacos e defesas imunológicas por não permitirem a entrada e fluidez dos medicamentos em sua estrutura (Thien et al, 2001; Hasan et al., 2009).

As resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses totais, próteses removíveis e aparelhos ortodônticos são sítios que favorecem a formação de biofilme na cavidade bucal, especialmente peças que passam por abrasão mecânica e por vezes não recebem polimento posterior causando rugosidades que favorecem a aderência microbiana e constituem fator etiológico importante no desenvolvimento das candidoses associadas ao uso de próteses (Paranhos et al., 2004). No presente estudo foram utilizados corpos-de-prova de resina acrílica de prótese ocular para quantificar em UFC/ml a formação de biofilme. A aderência de microrganismos à superfícies de materiais instalados na boca não está relacionado somente às resinas acrílicas, diversos materiais podem favorecer a formação de biofilme. Tsang e McMillan (2007) avaliaram a formação do biofilme formado por *C. albicans* na superfície de discos de titânio, material utilizado para implantes dentários

e relataram que houve aderência nos espécimes analisados. Os autores observaram que o biofilme foi mais resistente a antimicrobianos do que a forma planctônica. Foi avaliado no presente estudo a atividade antifúngica do extrato do chá verde em biofilme aderido aos espécimes de resina acrílica e os resultados obtidos demonstram que houve atividade fungicida com o uso do chá verde a 20%. A maioria das cepas de *C. albicans* estudadas foram suscetíveis ao tratamento com extrato de chá verde a 20%, exceto uma cepa de *C. albicans* ($p=0,0754$). O percentual médio de redução de todas as cepas foi de 59,2%. Esses dados indicam que *C. sinensis* apresentou efeito antifúngico nas cepas avaliadas.

Em nossos resultados, as espécies não *albicans* quando em biofilme, mostraram-se mais resistentes ao extrato do chá verde a 20%, apresentando percentual médio de redução de 48,5%. *C. krusei* ($p=0,0820$), *C. dubliniensis* ($p=0,1859$) e *C. glabrata* ($p=0,1618$) foram as espécies menos suscetíveis quando comparados ao controle. Esses dados estão de acordo com o estudo de Nakata et al. (2007), que avaliou o efeito antimicrobiano da *C. sinensis* em microrganismos isolados da saliva de 40 voluntários. O autor e seus colaboradores enfatizaram a importância do controle microbiano por substâncias naturais como o chá verde.

Sitheequ et al. (2009) avaliaram o efeito antimicrobiano dos polifenóis e catequinas encontradas na *C. sinensis* em várias espécies do gênero *Candida*, os autores relataram que as substâncias terapêuticas encontradas nessa planta possuíam atividade antifúngica em todas as espécies analisadas principalmente em *C. albicans* e relataram a importância de estudos mais detalhados para a aplicação clínica.

As práticas odontológicas envolvem riscos de contaminação tanto para profissionais quanto para pacientes, tornando tanto o consultório odontológico como o laboratório de prótese veículos de infecção cruzada devido ao contato com resíduos de saliva e sangue encontrados nos materiais para impressão, gesso e próteses (Majewski et al., 2004). Doenças como tuberculose, sífilis, varicela, herpes, candidoses e AIDS, podem ser transmitidas durante procedimentos clínicos no consultório odontológico.

As resinas acrílicas são consideradas artigos semi-críticos, por entrarem em contato com a mucosa íntegra do paciente. Esses materiais deveriam passar por processo de desinfecção ou esterilização, entretanto, como são termosensíveis, necessitam de desinfecção química, entretanto algumas substâncias são tóxicas, o que inviabiliza a utilização nas peças adaptadas na cavidade bucal (Chassot et al., 2006; Vickery et al., 2009).

O hipoclorito de sódio é um desinfetante utilizado em várias concentrações para desinfecção de artigos e superfícies clínicas e até mesmo na prática odontológica durante tratamento endodôntico para irrigar canal radicular, apesar de ter várias aplicações e baixo custo, oferece risco ambiental por persistir no meio ambiente por oito anos sem se degradar. O ácido peracético é uma substância utilizada em hospitais e em consultórios odontológicos como agente desinfetante sendo efetivo para fungos, vírus, bactérias e esporos. Tem sido aceito em substituição ao glutaraldeído e ao hipoclorito de sódio, por ser menos tóxico e não corrosivo aos materiais, além de ser degradado rapidamente sem deixar resíduo ambiental (Sagripante et al., 1996; Svidzinski et al., 2007).

Loukili et al. (2004) avaliaram a eficácia do ácido peracético em remover biofilme formado por *E. coli* em tubos de vidro, comparando diversas marcas comerciais deste produto. O ácido peracético foi muito efetivo na remoção do biofilme formado por essa *E. coli*.

Marques et al. (2007) compararam a efetividade do ácido peracético a 0,3% com outros desinfetantes como hipoclorito e dicloroisourato de sódio, em biofilmes formados por *S. aureus* em superfície de aço inoxidável e vidro. Os resultados indicaram que o ácido peracético comparado as outras substâncias foi mais eficiente em remover biofilme formado por *S. aureus* em todos materiais avaliados.

No presente estudo foi avaliado a atividade antifúngica do ácido peracético a 2% em biofilme formado por leveduras do gênero *Candida* em corpos-de-prova de resina acrílica. A concentração do ácido peracético foi utilizada a 0,5%. Em estudo piloto foram testadas três concentrações do ácido, 2%, 1% e 0,5% avaliados em biofilme. Foi observado que não houve crescimento microbiano nas duas primeiras

concentrações, optou-se pela concentração de 0,5% no tratamento dos corpos-de-prova.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que o ácido peracético a 0,5% foi efetivo na maioria das cepas analisadas. Houve redução UFC/mL na maioria das cepas e a média de redução foi de 63,3% para todas as cepas de *C. albicans* estudadas. Os resultados obtidos para as espécies não *albicans* apresentaram média de redução de 48,2%. *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* não foram suscetíveis ao tratamento com ácido peracético a 0,5%, não ocorrendo percentual de redução de UFC/mL. Resultado semelhante foi observado por Salvia et al. (2011) que avaliaram a atividade fungicida do ácido peracético a 2% em células planctônicas de *C. albicans*. Os autores relataram que houve redução fungicida significativa UFC/mL em relação ao grupo controle.

Apesar de muitos fitoterápicos serem utilizados como tratamento coadjuvante e alternativo nas patologias bucais, além das propriedades terapêuticas a toxicidade dessas substâncias deve ser considerada, (Vera-Cruz et al., 2010), pois podem desencadear reações adversas por seus próprios constituintes, em associação com outros medicamentos, alimentos ou pela própria condição física do paciente (Balbino, Dias, 2010). No presente estudo foi avaliado a citotoxicidade do extrato de *C. sinensis* em cultura de macrófagos de camundongos. Foram estudadas três concentrações do extrato, 10%, 5% e 2,5% (89,25%) e a viabilidade celular foi de 103,91%, 92,83% e 89,25% respectivamente. Observou-se viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas do extrato, e o mesmo não apresentou, portanto, citotoxicidade para as células estudadas.

Não houve diferença estatística entre viabilidade celular após aplicação do extrato e o controle. Esses resultados sugerem que o extrato do chá verde pode ser utilizado na cavidade bucal por apresentar viabilidade celular, entretanto não foi considerado neste estudo a possibilidade do extrato de *C. sinensis* causar manchamento nos dentes, propriedade comum atribuída às bebidas como chá e café.

Metodologia semelhante ao presente estudo foi utilizada por Martins et al. (2009) que avaliaram a citotoxicidade do extrato vegetal de duas espécies de arnica brasileira em fibroblastos da mucosa bucal

humana. Os autores utilizaram metodologia do MTT para verificar a viabilidade celular e concluíram que os extratos estudados foram biocompatíveis *in vitro* para células da mucosa bucal humana.

Em nosso estudo foi avaliada a citotoxicidade do ácido peracético nas concentrações de 2% e 1% em macrófagos de camundongos. Os resultados demonstraram que não houve efeito citotóxico nas diferentes concentrações analisadas, tornando o uso do ácido peracético viável em clínicas e hospitais, entretanto o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) não deve ser descartado no manuseio desta substância. A toxicidade e genotoxicidade do ácido peracético é considerada na literatura acima de 3%, entretanto, em concentrações menores pode causar irritação na pele e macular a retina (Vera-Cruz et al., 2010; Loukili et al., 2004)

Os freqüentes relatos de resistência de *C. albicans* e espécies não *albicans* têm sido relacionado à quimioprofilaxia e ao tratamento com antifúngicos, em especial o fluconazol. A eficácia desse medicamento no tratamento da candidose orofaríngea é atribuída às suas características como baixa toxicidade e amplo espectro de ação, sendo o fármaco de escolha primária nos tratamentos. Embora sejam inúmeros os fármacos antibacterianos disponíveis no mercado os antifúngicos ficam em desvantagem quando comparados aos outros antimicrobianos, os fungos são células eucarióticas e algumas espécies apresentam suscetibilidade diferencial ou total insensibilidade, tornando difícil a escolha de um fármaco adequado (Krcmery, Barnes, 2002; Aquino et al., 2005; Ramage et al., 2011).

Enwuru et al. (2008) estudaram a prevalência de espécies de leveduras em pacientes HIV-positivos que apresentavam candidose orofaríngea e verificaram a suscetibilidade aos antimicrobianos. A espécie de maior prevalência foi *C. albicans* seguido de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*. Dos 74 isolados 58 foram sensíveis ao fluconazol (8 µg/mL) e 7 foram resistentes (64 µg/mL). Dentre os 7 resistentes 3 foram *C. albicans*, 2 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis* e 1 *C. dubliniensis*. Os autores relataram que o fluconazol é efetivo em algumas espécies do gênero *Candida*. Os resultados do presente estudo

indicaram que os isolados de *C. albicans* foram sensíveis ao fluconazol (0,5 a 32 µg/mL) em diferentes concentrações.

Esses dados estão de acordo com o estudo de Enwuru et al. (2008) que observaram suscetibilidade ao fluconazol em várias espécies do gênero *Candida*. As espécies não *albicans* analisadas neste trabalho também mostraram-se sensíveis ao fluconazol (0,25 a 32 µg/mL) em diferentes concentrações.

Brito et al. (2010) isolaram leveduras da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos e verificaram a suscetibilidade a vários antifúngicos, dentre eles ao fluconazol e anfotericina B. Os autores relataram que houve suscetibilidade distinta entre as espécies, mas não houve resistência ao fluconazol. Dos 57 isolados 2 foram resistentes à anfotericina B, CIM >2 µg/ml.

Em nosso estudo observamos que as espécies não *albicans* foram mais resistentes à anfotericina B do que *C. albicans*. *C. glabrata* (4 a 8 µg/mL), *C. tropicalis* (4 µg/mL), *C. krusei* (8 µg/mL) foram mais resistentes ao antifúngico avaliado, entretanto 2 cepas de *C. albicans* (4 a 8 µg/mL) mostraram-se resistentes.

Atualmente os antimicrobianos são produzidos industrialmente em grande número para o tratamento de infecções causadas por fungos e bactérias. Os antifúngicos fluconazol e anfotericina B são os fármacos freqüentemente utilizados no controle de infecções fúngicas, tanto superficiais quanto sistêmicas, respectivamente (Patel et al., 2006; Panackal et al., 2006). Os dados observados neste estudo estão de acordo com a literatura, pois as leveduras estudadas foram suscetíveis aos antifúngicos analisados. Embora o uso de antimicrobianos seja amplamente difundido, o uso de fitoterápicos como terapia alternativa ainda é criterioso, principalmente na odontologia que visa segurança ao paciente nos tratamentos aplicados na cavidade bucal. O extrato de chá verde analisado neste estudo demonstrou atividade antimicrobiana satisfatória nas cepas clínicas analisadas e não apresentou citotoxicidade nas células de macrófagos, viabilizando seu uso como enxaguatório nas lesões e infecções localizadas da cavidade bucal.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram obter as seguintes conclusões:

- a) o extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) avaliado apresentou atividade antifúngica em células

planctônicas e em biofilme para todas as cepas de *Candida* avaliadas;

b) o ácido peracético apresentou efeito antimicrobiano em células planctônicas e em biofilme na maioria das cepas de *Candida* avaliadas;

c) o ácido peracético e o extrato vegetal de *Camellia sinensis* (chá verde) não foram citotóxicos em células de macrófagos *in vitro*;

d) o fluconazol apresentou efeito fungistático em células planctônicas e as cepas de *Candida* avaliadas não apresentaram resistência ao mesmo;

e) a anfotericina B apresentou efeito antifúngico nas cepas de *C. albicans* e ocorreu resistência microbiana nas cepas não *albicans*.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram obter as seguintes conclusões:

- a) o extrato de *Camellia sinensis* (chá verde) avaliado apresentou atividade antifúngica em células planctônicas e em biofilme para todas as cepas de *Candida* avaliadas;
- b) o ácido peracético apresentou efeito antimicrobiano em células planctônicas e em biofilme na maioria das cepas de *Candida* avaliadas;
- c) o ácido peracético e o extrato vegetal de *Camellia sinensis* (chá verde) não foram citotóxicos em células de macrófagos *in vitro*;
- d) o fluconazol apresentou efeito fungistático em células planctônicas e as cepas de *Candida* avaliadas não apresentaram resistência ao mesmo;
- e) a anfotericina B apresentou efeito antifúngico nas cepas de *C. albicans* e ocorreu resistência microbiana nas cepas não *albicans*.

REFERÊNCIAS*

Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drog resistance human pathogens. J Ethnoph. 2001;74(2):113-3.

Akroum S, Satta D, Lalaoui K. Antimicrobial, antioxidant, citotoxicity activies and phytochemical screening of some algeriam plants. Europ J Scienc Res. 2009;31(2):289-95.

Alvarenga AL, Schwan RF, Dias DR, Schulan KRF, Bravo CEC. Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. Rev Brás Méd, Botucatu. 2007;9(4):86-9.

Alves PM, et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral. Braz J Pharmacognosy. 2006;16(2):192-6.

Appleton SS. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics and treatment. J Calif Dent Assoc. 2000.;28(12):942-8.

Aquino VR, Lunard LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, suscetibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2005;9(5):411-8.

* Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em : http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Balbino EE, Dias MF. Fármacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas e fitoterápicos. Braz J Pharmacognosy. 2010; 20(6):992-0.

Balducci RBE, Silverio G K, Malagoli DM. Processo de reparo em feridas

de extração dentária em camundongos tratados com *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*. Rev Odont Univ S P. 1999; 13(2):181-7.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(6):588-94.

Brito GNB, Inocêncio AC, Querido SMR, Jorge AOC, Koga-Ito CY. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individual. Braz Oral Res. 2010;25(1):28-33.

Castilho AR, Murata RM, Pardi V. Produtos naturais em odontologia. Rev. Saúde, São Paulo. 2007;1(1):11-19.

Chassot ALC, Poisl MIP, Samuel SMW. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the efficacy of a peracetic acid based disinfectant for descontamination of acrylic resins. Bras Dent J. 2006;17(2):117-21.

Coco BJ, Cross LJ, José A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* population associated with the pathogenesis of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(5):377-383.

Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. J Ethnoph. 2005;97(2):305-11.

Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. Basic Res Biol. 2007;33(7):815-8.

Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister EW. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow systems. J Oral Rehabil. 2004;31(3):278-5.

Enwuru CA, Ogunledun A, Idika N, Enwuru NV, Ogbonna F, Aniedobe M, Adeiga A. Fluconazole resistance opportunistic oro-pharyngeal *Candida* non-*Candida* yeast like isolates from HIVinfected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigéria. African Health Sciences. 2008;8(3):142-8.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. Rev Brás Cienc Farm. 2006;42(2):167-3.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans* Med Mycol. 2000; 38(5):355-62.

Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes Infect. 2009;11(8):753-1.

Hospital DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presentive identification of *Candida* species other *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* with the chromogenic medium CHROM-agar *Candida*. Annals of Clin. Antim. 2005;5(1):1-5.

Kantorski KZ, Pagani C. Influence of the surface roughness of the dental material in the bacterial adhesion. Rev Odontol Univ S P. 2007;19(3):325-30.

Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infec. 2002;50(4):243-60.

Loukili NH, Zink E, Grandadam S, Bientz M, Meunier O. Effectiveness of detergent disinfecting agents on *Escherichia coli* biofilm. J Hosp Infec. 2004;57(2): 175-8.

Majewski M, Koga-Ito CY, Junqueira JC, Jorge AOC. Avaliação das condutas de biossegurança aplicadas em laboratórios de prótese dentária. Rev Bioc Taubaté. 2004;10(3):161-6.

Majewski M. Efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Candida* isoladas de pacientes submetidos à antibióticoterapia prolongada [dissertação]. São José dos Campos. Faculdade Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Paulista-UNESP, 2008.

Magliorati CM, Birman EG, Cury AM. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endodont. 2004;98(3):301-10.

Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Ferrari RAM, Pavessi VCS, Wadt NS, et al. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira e arnica paulista. ConSc Saúde. 2009;8(1):99-4.

Marques SC, Rezende JGOS, Alves LAF, Silva BC, Alves E, Alves LR, Piccoli RH. Formação de *S. aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanitizantes químicos. Braz. J. Microb. 2007;38(3):538-3.

Matsuki M, Kanatsu H, Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, Matsumoto T. Effects of antifungal drugs on proliferation signals in *Candida albicans*. Biol Pharm Bull. 2006;29(5):919-22.

Menezes TOA, Alves ACBA,, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Rev Odont UNESP. 2009;38(3):184-91.

Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: norma aprovada – 2ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1- 56238 – 469 – 4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2000.

Michelin DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Braz J Pharmacog. 2005;15(4):316-320.

Miller-Hamilton JMT. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis*). Anti Agents Chemother. 1995;39(11):2375-2377.

Miller-Hamilton JMT. Anti-cariogenic properties of tea *Camellia sinensis*. J. Med Microbiol. 2001;50(4):299-302.

Modesto A, Lima KC, Uzeda M, . Atividade antimicrobiana de três dentifrícios utilizados na higiene oral de bebês. Rev Ass Paul Cir Dent. 2001;55(1),43-8.

Molina FP, Majewski M, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, salvia, calêndula and castor-antifungal activity of natural extracts on *C. Albicans* strains. Cienc Odontol Bras. 2008;11(2):86-93.

Nadagir SD, Chunchanur SK, Halesh LH, Yasmeen K, Chandrasekhar

MR, Patil BS. Significance of isolation and drug susceptibility testing of non-*Candida albicans* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *South Asian J Trop Med Public Health*. 2008;39(3):492-5.

Nakata HM, Cadillo EM, Gastelu JV, Sanches JB, Perfecto DR. Efeito antimicrobiano *in vitro* de la *Camellia sinensis* sobre bactéria orales. *Odontol Sanmarquina*. 2007;10(1):18-20.

Navas EAFA, Carretto CFP, Paradilla TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (abstract Pa133). *Braz Oral Res*. 2006;36(3):286-6.

Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Brás Farmacol*. 2007; 17(3):466-6.

Paranhos HFO, Silva CHL, Cruz PC. Métodos de quantificação de biofilme em prótese total: revisão da literatura. *Rev Odont UNESP*. 2004;33(4):203-10.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996 Jan.;34(1):58-61.

Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr, KA. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2006 May; 44(5):1740-3.

Patel M, Shackleton JT, Coogan MM. Effect of antifungal treatment on the prevalence of yeasts in HIV-infected subjects. *J Med Microbiol*. 2006;55:1279-84.

Perea S, Ribot JLL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmanm SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from HIV infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Ant Agents Chem*. 2002;46(6):1695-703.

Pereira AV, Almeida TC, Beltrame FL, Costa ME, Garrido LH.

Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chá verde e preto (*Camellia sinensis*). Acta Scientiarum Health Sciences. 2009;31(2):119-4.

Ramage G, Coco B, Rajedran R, Rautema R, Murray C, Lappin DF, Bagg J. Commercial mouthwashes are more effective *in vitro*. Oral Surg Med Oral Radiol Endod. 2011;8;205-9.

Retta SM, Sagripante JL. Modeling the inactivation kinetics of *Bacillus ssp.* spore by glutaraldehyde. Letters Appl Microbiol. 2008;46(5):568-74.

Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM, Michel AP. *Candida albicans* biofilm defective mutants. Eukaryotic Cell. 2005;4(8):1493-502.

Sagripanti JL, Bonifacino A. Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents. Applied and Environmental Microb. 1996;62(2):545-51.

Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EHN, Beena VT, Yeung KWS. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. J Clin Microbiol. 2001 Sept.;39(9):3296-302.

Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Higsmith J. *In vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. Int J Prosthodont. 2005;18(5):392-8.

Silva FC, Paradella TC, Navas EAFA, Claro APSA, Ito CYK, Jorge AOC. Influence of disinfecting agents on the adherence of *Staphylococcus aureus* on stainless steel. Cien Odont Bras. 2008;11(3):60-5.

Silva SRS, Oliveira TT, Nagem TJ. Uso do chá preto (*Camellia sinensis*) no controle do diabetes *mellitus*. Rev Cienc Farm Bras Aplic. 2010;31(3):133-2.

Shivaprakash S, Radhakrishnan K, Karim PMS. *Candida ssp.* other than *Candida albicans*: a major cause of fungaemia in a tertiary care centre. Indian J Med Microbiol. 2007;25(4):405-7.

Sitheequ MAM, Panagoda GP, Yau J, Amarakoun AMT, Udagama URN, Samaranayake LP. Antifungal activity of black tea polyphenols against *Candida* species. Intern J Exper Clin Chemoth. 2009; 55(3):189-6.

Svidzinski AE, Posseto I, Padua RAF, Tavares TR, Svidzinski TIE. Eficiência do ácido peracético no controle de *Staphylococcus aureus* metilina resistente. Cienc Cuid Saúde. 2007;6(3):312-8.

Wengeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Microbiological identification and in vitro sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV positive individuals. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(3):272-6.

White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002 June;46(6):1704-13.

Tsang CSP, Ng H, Mcmillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. Clin Oral Invest. 2007; 11(4): 361-8.

Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Feb.; 93(2):155-60.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol. 2007;52(8):761-7.

Vera-Cruz M, Nunez E, Mendonça L, Chaves E, Fernandes MLA. Efeito do chá verde em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. J Bras Patol Méd. 2010;46(5):407-3.

Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA. Dados farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Braz J of Pharmac. 2005;15(4): 361-2.

Vickery K, Quan D, Zou J, Cossat YE. The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. *AJIC*. 2009;32(3):170-6.

Yam TS, Shah S, Hamilton-Miller. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*) and of tea components, *Fems Microb Letters*. 1997;152(1):169-4.

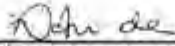
ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Lemos, 773 - Jd. São Domus
- 131 12201-070 - F: (13) 7947-0028
Fax: (13) 7947-0810 - janete@fod.unesp.br

 CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **028/2010-PH/CEP**, sobre
“**Avaliação antifúngica do ácido peracético e extrato vegetal sob**
leveduras do gênero Candida spp.”, sob a responsabilidade de **MARTA**
MAJEWSKI, tendo como orientador o Professor Titular Antonio Olavo
Cardoso Jorge, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo
diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres
humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde
e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 08 de junho de 2010.



Profa. Adjunta **JANETE DIAS ALMEIDA**
Coordenadora

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Marta Majewski

RG: 187265021

Telefone: (12) 81307529

E-mail do autor: marta_biologa@ig.com.br

Autoriza a divulgação deste endereço eletrônico na [C@thedra](http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital)? ☒ Sim ☐ Não

☐ **Dissertação de Mestrado** ☒ **Tese de Doutorado** ☐

Tese de Livre-Docência

Título: AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO PERACÉTICO E
EXTRATO DE *Camellia sinensis* (CHÁ VERDE) EM *Candida* spp.

Palavras-chave: Ácido peracético. Desinfecção. Fitoterápicos. *Candida* spp.

Campus: São José dos Campos

Programa de Pós-Graduação: Biopatologia Bucal

Área de Concentração: Microbiologia/Imunologia

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge

Co-orientador:

Banca: Antonio: Olavo Cardoso Jorge, Luana Marotta Reis de Vasconcelos, Thaís Cachulé Paradella, Célia Regina Gonçalves e Silva, Graziella Nuemberg Back Brito

Data da defesa: 12/06/2011

(☒) **AUTORIZO** a Universidade Estadual Paulista - UNESP, a publicar através do site <http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital>, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral da obra acima citada, em formato PDF, a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade, em conformidade com o estabelecido pela CAPES (**PORTARIA No- 13, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2006**).

Marta Majewski
Assinatura do(a) autor(a)

Data: 09 / 09 /2011

OBS.: Preencher este Termo em duas vias assinadas. A primeira, permanece na Seção de Pós-graduação e a segunda será encaminhada à Biblioteca da Unidade juntamente com o arquivo eletrônico em formato PDF.