

MARJORIE ADRIANE DA COSTA NUNES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
EXTRATOS VEGETAIS SOBRE *CANDIDA SPP.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Amaral Pereira
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana Amado Libério

São Luís
2015

MARJORIE ADRIANE DA COSTA NUNES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS SOBRE *CANDIDA SPP.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Amaral Pereira
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Amado Libério

São Luís

2015

Nunes, Marjorie Adriane da Costa

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos vegetais sobre *Candida* spp./ Marjorie Adriane da Costa Nunes.- 2015.

40f.

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientador: Antonio Luiz Amaral Pereira.

Coorientador: Silvana Amado Libério

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2015

1. Microbiologia; plantas medicinais; biofilme; *Candida albicans* I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de espécies vegetais sobre *Candida*.

CDU

MARJORIE ADRIANE DA COSTA NUNES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS SOBRE *CANDIDA SPP.***

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia / / , considerou a candidata

() APROVADA

() REPROVADA

1) Examinador(a) _____

2) Examinador(a) _____

3) Presidente (Orientador) _____

Dedico este trabalho....

*À minha amada mãe **Bartolomea Nunes**, meu exemplo maior de força e perseverança. Sem sua presença acalentadora, seu devotado amor, apoio e incentivo, a realização de mais esse sonho seria impossível. “Obrigada” seria muito pouco, pelo muito que fez e faz por mim.*

*Ao meu esposo, **Nielsen Barros**, pelo encorajamento, pelo suporte, pelo carinho, pelo companheirismo, pela ajuda concreta e por ter me dado o maior de todos os títulos que eu poderia ter: o de mãe. Obrigada por fazer parte da minha vida.*

*Ao meu filho, **Bernardo**, por trazer tanta alegria à minha vida. Saber da sua existência e carregar você comigo me tornou mais forte, paciente e feliz para enfrentar esses momentos nem sempre tão amenos.*

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, professor Antonio Luiz Amaral Pereira. Agradeço pela receptividade, pela abordagem sempre tranquila e pelo exemplo de profissional atuante e engajado, sempre buscando o melhor para o engrandecimento da nossa odontologia.

À professora Silvana Amado Libério, pela dedicação e por não ter medido esforços para que este trabalho acontecesse. Obrigada por ter me recebido mais uma vez e obrigada também pelos seus ensinamentos, pelo exemplo de competência e profissionalismo.

Ao professor Frederico Fernandes e à professora Silvia Lucena. Agradeço pela acolhida, pela paciência, pelo carinho com que me trataram, por estarem sempre prontos a me ouvir e me ajudar em tudo o que precisei. Muito obrigada por tudo!

Agradecimentos

A Deus, meu eterno guia, que ilumina e conduz todos os meus passos, principalmente nos momentos difíceis, não deixando que eu desista frente aos obstáculos. Obrigada por mais esta oportunidade.

Aos técnicos do laboratório de microbiologia Ivaldo e Taís que sempre se dispuseram a colaborar e me acompanharam em todas as etapas, esclarecendo minhas dúvidas tantas e tantas vezes, mesmo estando tão ocupados. Muito obrigada!

Ao amigo Thiago Barros, por ter sido o primeiro a me estender a mão e me acompanhar nos momentos de insegurança no laboratório.

À amiga Amanda Cavalcante. Sem você eu não conseguiria. Sua competência e sua disponibilidade em ajudar foram fundamentais pra mim. A você minha eterna gratidão.

À professora Flávia Maria Mendonça do Amaral, pelo apoio à pesquisa e disponibilização do Laboratório de Fitofármacos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão para elaboração dos extratos.

À Jéssyca Wan Lume, pela fundamental ajuda na manipulação dos extratos vegetais.

À Professora Flávia Nascimento, pela permissão de uso dos equipamentos do Laboratório de Imunofisiologia desta Instituição.

À Mariana Oliveira Arruda, por sua maneira sempre gentil e atenciosa de ajudar.

A Jefferson Mesquita por sua disponibilidade em me acompanhar no laboratório de Imunofisiologia sempre que solicitado.

À querida Josi Coelho, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMA. Sua ajuda e presteza foram essenciais em todo esse tempo. Obrigada pelo tratamento sempre atencioso e solícito. Você foi um anjo para mim!

Ao meu irmão, Flávio e sua esposa Teodora, por compartilhar comigo o seu maior tesouro, minha tão amada Luísa, que encheu meus dias de alegria.

Aos meus sogros Vicente e Edna, aos cunhados Nielma, Francisco e Ítalo e ao meu querido afilhado Guilherme por suas orações, sua torcida e por compreenderem tão bem as minhas ausências.

Às minhas amigas de turma Cíntia Rosalem, Luana Dias, Monique Mouchrek, Mayara Abas Frazão e Samantha Freitas. Minhas amadas Luluzinhas, a convivência com vocês tornou o mestrado muito mais leve e acolhedor. Obrigada pela paciência e pelo apoio, sempre. Meu respeito e admiração a cada uma de vocês!

À minha amiga Cíntia Rosalem, um exemplo de serenidade, generosidade e competência. Você sim é muito especial e querida. Sua amizade é um presente pra mim!

Às amigas Cadidja Dayane, Camilla Figueiredo, Gisele Quariguasi, Ana Clara, professora Beth. Conviver com vocês foi muito bom!

A todos os professores e funcionários da UFMA, que direta e indiretamente contribuíram para a minha formação e aos que me deram palavras de incentivo. Minha sincera gratidão!

Sumário

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 CAPÍTULO I - Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica de extratos vegetais sobre <i>Candida spp.</i> da cavidade oral	6
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	26
ANEXO – Normas da Revista Brasileira de Farmacognosia	30

Resumo

Leveduras do gênero *Candida* estão frequentemente associadas à mucosa oral normal. Porém, em situações específicas, como alterações imunológicas, químicas e mecânicas, podem desencadear infecções denominadas candidíase. Quando associada ao uso de próteses, a candidíase é denominada estomatite protética. O biofilme de *Candida* é considerado o principal fator etiológico da estomatite protética e sua remoção da base da prótese se faz necessária por meio da utilização de limpadores químicos associados ou não a agentes antifúngicos. Entretanto, diante a ocorrência de resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos sintéticos, bem como reações indesejadas apresentadas, faz-se necessário a investigação de terapias mais eficazes. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico de extratos vegetais sobre *Candida* spp. e sobre biofilme formado em espécimes de resina acrílica. Realizou-se estudo laboratorial, *in vitro*, por meio da análise da atuação de extratos vegetais (folhas de *Passiflora edulis* e *Psidium guajava* L., casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi, mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart. e folhas e cascas de *Anacardium occidentale* L.), numa concentração de 100mg/ml, sobre cepas padrão de *C. albicans* (ATCC90028) e *C. glabrata* (ATCC2001). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de microdiluição em caldo, seguindo-se de subcultivos em ágar para determinação da Concentração Fungicida Mínima. Os controles positivos foram gluconato de clorexidina 0,12% e fluconazol 128 µg/mL. Foi também avaliado o efeito do extrato de *Psidium guajava* sobre biofilme de *C.albicans* (ATCC90028) formado sobre espécimes de resina acrílica. Os espécimes foram submetidos aos tratamentos: extrato vegetal de *Psidium guajava* na concentração de 300mg/ml (15 min); hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% (10 min) como controle positivo e como controle negativo água destilada e deionizada (15 min). O número de células viáveis de *Candida* foi expresso em unidades formadoras de colônia (UFC)/mm². O extrato de *Psidium guajava* L., apresentou halos de inibição de 17,08 mm para *C. albicans* e de 20,41 mm para *Candida glabrata*. Os demais extratos não formaram halos de inibição para as cepas testadas. A CIM e CFM do extrato de *Psidium guajava* para *C. albicans* foi 15mg/ml e 30mg/ml respectivamente e para *C. glabrata* 3,75mg/ml e 15mg/ml. Com relação ao efeito do extrato sobre o biofilme, observou-se uma redução significativa de UFC em espécimes de resina acrílica quando comparado ao grupo

controle negativo. Concluiu-se, neste estudo que, apenas o extrato das folhas de *Psidium guajava* apresentou atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* e que o mesmo reduziu significativamente o biofilme formado sobre espécimes de resina acrílica.

Palavras- chave: Plantas medicinais; Biofilme; *Candida Albicans*

Abstract

Candida yeasts are often associated with normal oral mucosa. However, in specific situations, such as immunological, chemical and mechanical changes, can trigger infections called candidiasis. When associated with the use of prostheses, candidiasis is called denture stomatitis. *Candida* biofilm is considered the main etiological factor in denture stomatitis basis of the prosthesis and its removal is necessary by the use of chemical cleaners associated or not to antifungal agents. Given this, the objective of this study was to evaluate the antifungal potential of plant extracts on *Candida* spp. and on biofilm formed in acrylic resin specimens. We conducted laboratory study, in vitro, by analyzing the performance of plant extracts (*Passiflora edulis* leaves and *Psidium guajava* L., peel *Schinus terebinthifolius* Raddi, mesocarp *Orbignya phalerata* Mart. And leaves and bark of *Anacardium occidentale* L.) at a concentration of 100mg / ml of standard strains *C. albicans* (ATCC90028) and *C. glabrata* (ATCC2001). The antimicrobial activity was evaluated by the agar diffusion method, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution broth method, followed by the subcultures in agar to determine the concentration Fungicide Min. The positive controls were 0.12% chlorhexidine gluconate and fluconazole 128 mg / mL. It was also evaluated the effect of *Psidium guajava* extract of *C. albicans* biofilm (ATCC90028) formed on acrylic resin specimens. The specimens were submitted to the treatments: herbal extract of *Psidium guajava* in the concentration of 300mg / ml (15 min); Sodium hypochlorite (NaOCl) 0.5% (10 min) as positive control and negative control as distilled and deionized water (15 min). The number of viable *Candida* cells was expressed as colony forming units (CFU) / mm². The *Psidium guajava* L. extract presented halos of inhibition of 17.08 mm for *C. albicans* and *C. glabrata* to 20.41 mm. The other extracts did not form inhibition zones for the tested strains. The MIC and MFC of *Psidium guajava* extract for *C. albicans* was 15mg / ml and 30mg / ml respectively and *C. glabrata* 3.75mg / ml and 15mg / ml. With respect to the effect of the extract on the biofilm, it was observed a significant reduction in CFUs acrylic resin specimens when compared to the negative control group. It was concluded in this study that the extract of *Psidium guajava* leaves showed antifungal activity against strains of *C. albicans* and *C. glabrata* and that it significantly reduced the biofilm formed on the acrylic resin specimens.

Key words: Medicinal plants; Biofilm; *Candida albicans*

1 Introdução

As infecções fúngicas têm sido mais frequentes nos últimos anos, ocorrendo com maior gravidade em pacientes portadores de doenças de base que comprometem o sistema imune e que apresentam outros fatores de risco, como dispositivos invasivos e uso de antibacterianos (Pedroso *et al.*, 2014).

Os fatores predisponentes sistêmicos ou locais mais comumente envolvidos nestas infecções são baixa imunidade, desordens endócrinas, prolongada terapia antibiótica, corticoterapia, fatores nutricionais, baixo fluxo salivar, uso de imunossuppressores, doenças que causam imunodeficiência, como a AIDS, próteses removíveis mal adaptadas e mal higienizadas e lesões em tecidos moles (Akpan e Morgan, 2002; Samaranayake *et al.*, 2009; Muzyka, 2005).

Candidíase e candidose são termos utilizados na literatura para denominar a infecção fúngica causada pela *C. albicans*, sendo candidíase o termo mais comumente empregado na comunidade médico-odontológica (Scalercio *et al.*, 2007).

A candidíase inclui um grupo de condições mucosas e cutâneas com um agente etiológico comum do gênero *Candida* (Oliveira *et al.*, 2006), que é composto por cerca de 150 espécies de leveduras, das quais algumas apresentam importância médica, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi* e *C. dubliniensis* (Ribeiro *et al.*, 2009). Numerosos estudos indicam que *C. albicans* é mais frequente do que as outras espécies, respondendo por 80 a 90% dos casos de candidíase. Entretanto, nos últimos anos, tem-se observado um aumento na frequência de espécies *não-albicans*, principalmente de *C. glabrata*, *C. tropicallis* e *C. guilliermondi* indicando uma tendência de mudança na etiologia da candidíase após décadas de predomínio da *C. albicans* (Holanda *et al.*, 2007).

O aumento na prevalência de infecções causadas por *Candidas não-albicans* é preocupante, na medida em que essas espécies são mais resistentes aos agentes antifúngicos comumente utilizados (Bagg *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007), em especial as infecções ocasionadas pela *C. glabrata*, a qual está fortemente associada a infecções sistêmicas generalizadas com alta taxa de mortalidade (Li *et al.*, 2007; Pfaller e Diekeman, 2007).

Na cavidade bucal, a proliferação ou infecção por leveduras do gênero *Candida* pode ser observada principalmente na primeira infância, senescência e em pacientes imunocomprometidos. O diagnóstico fundamenta-se nos sinais clínicos detectados no exame físico associado aos exames laboratoriais (Costa e Cândido, 2007). Tais exames possibilitam não só a quantificação dos níveis orais de *Candida*, mas também a identificação das espécies envolvidas na infecção. Saber qual espécie prevalece na infecção é importante, pois a escolha do antimicrobiano pode variar de acordo com a *Candida* identificada. (Freitas *et al.*, 2011).

Quando associada ao uso de próteses, a candidíase é denominada de estomatite sob prótese ou estomatite protética e consiste em uma lesão comumente observada sob a área chapeável da prótese, acometendo cerca de 65% dos usuários de prótese totais superiores e sua etiologia é multifatorial podendo estar associada à alergia ao monômero residual, trauma, uso contínuo da prótese, hipossalivação (Scalercio *et al.*, 2007). Porém, o biofilme de *Candida* formado sobre a base da prótese é considerado o principal fator etiológico da estomatite protética (Mukherjee *et al.*, 2005; Pereira-Cenci *et al.*, 2008)

Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos (Kuhn *et al.*, 2002). Donlan e Costerton (2002) definiram biofilme como sendo uma comunidade séssil caracterizada por células que formam micro colônias e que estão aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, embebidas numa matriz exopolimérica de substâncias extracelulares exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética.

Esse tipo de crescimento proporciona, aos microrganismos que o constituem, importantes benefícios, tais como: aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes; proteção contra fatores ambientais agressivos, como flutuações de pH, concentrações de sais, desidratação, forças de tensão de corte, substâncias químicas agressivas, bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados; possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos; facilidade de desenvolvimento de micro consórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose, bem como a utilização de substratos de difícil degradação e capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos. Desta forma, os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente dos

microrganismos na forma planctônica, no que diz respeito ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas (Flemming, 1993; Mittelman, 1998).

O tratamento da estomatite protética, assim como a prevenção, se dá principalmente, pela eliminação do fator etiológico, que é o biofilme de *Candida*. Apesar da terapia antifúngica tratar a estomatite protética, a infecção é restabelecida tão logo cesse o tratamento (Anibal *et al.*, 2010). Desta forma, é indicada uma terapêutica direcionada para a base da prótese e em muitos casos, essa terapêutica é suficiente para o tratamento da patologia (Souza *et al.*, 2009).

Neste contexto é de suma importância a adequada higienização da prótese, sendo a escovação o método mais utilizado, pois é considerado simples e barato (Paranhos *et al.*, 2007). Entretanto, não é capaz de remover a *Candida* presente nas microporosidades da resina acrílica, principal fator etiológico da estomatite protética, sendo necessário um método de limpeza complementar (Nikawa *et al.*, 1999; Catão *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2011). A proliferação do fungo inicia-se dentro da placa da prótese e não no tecido, e em casos de estomatite protética está indicada além da limpeza mecânica, a desinfecção da prótese com o uso de soluções químicas (Nikawa *et al.*, 1999).

O método químico é realizado por meio da imersão das próteses em produtos que possuem ação solvente, detergente, fungicida e bactericida (Catão *et al.*, 2007). Diversos produtos têm sido empregados para higienização de próteses removíveis, dentre eles destacam-se os limpadores de prótese à base de peróxido e o hipoclorito de sódio (Catão *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2011). Apesar de interferir na formação do biofilme, os limpadores à base de peróxido não são capazes de eliminar completamente o biofilme de *Candida* da base da prótese (Jose *et al.*, 2010; Freitas Fernandes *et al.*, 2011). Esse fator é preocupante, visto que um estudo recente observou que ao contrário do que se pensava, esse biofilme residual não tem seu desenvolvimento limitado pelo uso diário do limpador, e sim, as células de *Candida* desenvolvem-se continuamente e tornam-se mais virulentas (Freitas Fernandes *et al.*, 2011). Por outro lado, o hipoclorito de sódio, não tem uma boa aceitação pelos pacientes, os quais reclamam do odor e sabor desse produto (Budtz-Jorgensen, 1979; Yilmaz *et al.*, 2005).

No caso da persistência da estomatite protética, mesmo com a mudança dos hábitos de higiene da prótese, faz-se necessário o emprego de agentes antifúngicos locais ou sistêmicos (Freitas *et al.*, 2011). Os polienos, fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e alilaminas são as classes de drogas antifúngicas disponíveis atualmente no mercado,

entretanto, apresentam desvantagens que podem contribuir para o aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos de uso clínico, o que é atualmente um problema de difícil solução (REF). Muitas destas são fungistáticas e não fungicidas, algumas não possuem amplo espectro de ação, outras não são seletivas para o fungo, sendo tóxicas para o hospedeiro. As drogas azólicas principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia antifúngica (Beck-Sague e Jarvis, 1993; Rex *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007). Porém, como desvantagem, há o fato de não possuir ação sobre algumas espécies de *Candida*, como a *C.glabrata* e a *C. krusei*. (Saramanayake *et al.*, 2009).

Mediante a ocorrência de resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos sintéticos, bem como reações indesejadas apresentadas pelos usuários, faz-se necessário o estudo de outras terapias mais eficazes (Paiva *et al.*, 2009). Nesse sentido, relatos na literatura têm demonstrado que muitos extratos vegetais apresentam atividade antimicrobiana sobre patógenos bucais entre eles, *C. albicans*. (Alves *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009; Fonseca e Botelho, 2010; Cavalcanti *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as plantas seriam as melhores fontes para a obtenção de uma ampla variedade de drogas e poderiam beneficiar uma grande parte da população (Sardi *et al.*, 2013).

A extensa biodiversidade da flora brasileira e a capacidade de produção de constituintes químicos ativos das plantas em um país tropical como o Brasil tornam mais relevantes ainda a busca de produtos naturais com potencial atividade biológica, capazes de serem empregados clinicamente para o tratamento de enfermidades (Ferro *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2009; Lubian *et al.*, 2010).

Há anos, produtos naturais têm sido utilizados como terapêutica alternativa, entretanto, apenas 1% dos produtos utilizados consegue reconhecimento científico (Khan *et al.*, 2009).

Vários estudos destacam a importância das indicações terapêuticas das plantas medicinais como método alternativo e de baixo custo, na clínica odontológica (Alves *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2012). O estudo de compostos e extratos de produtos naturais tem sido realizado visando a obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem a prevenção de doenças bucais, especialmente as relacionadas ao biofilme dental, com o máximo de efetividade e o mínimo de agressão ao organismo (Botelho *et al.*, 2007).

A triagem de extratos vegetais da flora brasileira com atividade antifúngica pode contribuir para identificação de produtos naturais com potente atividade inibitória frente ao biofilme de *Candida*, o que poderá ser útil em trazer subsídios para auxiliar no controle desses microrganismos no meio bucal (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Os extratos de casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi e folhas de *Psidium guajava* L., mostraram em estudo *in vitro* potencial atividade antimicrobiana e antiaderente sobre os microrganismos formadores no biofilme dental, como também demonstraram atividade antifúngica sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade oral (Alves *et al.*, 2009). O mesocarpo do fruto de *Orbignya spp* mostrou-se eficaz contra microrganismos patogênicos, compreendendo uma promissora fonte de fármacos antimicrobianos (Batista, 2008). Agizzio *et al.* (2003) relataram que uma proteína isolada da semente de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* possui atividade antifúngica; Queiroz (1998) testou a ação de extratos de *Anacardium occidentale* (cajueiro) frente a isolados de *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. kruzei* e *C. tropicallis* e observou efeito inibitório frente às leveduras estudadas.

Diante da necessidade de identificar substâncias alternativas ao uso de medicamentos tradicionais e que apresentem uma ação antifúngica eficiente frente a microrganismos resistentes, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de espécies vegetais *Passiflora edulis*, *Psidium guajava* L., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Orbignya phalerata* Mart. e *Anacardium occidentale* L. sobre cepas padrão de *C. albicans* (ATCC90028) e *C. glabrata* (ATCC2001), bem como observar sua ação sobre biofilme de *C. albicans*.

2 Capítulo I

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE *CANDIDA SPP.*

(a ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia)

In vitro evaluation of the antifungal activity of plant extracts on *Candida spp.*

Marjorie A.C. Nunes^a, Silvana A. Libério^b, Antônio L. A. Pereira^{c*}

^a Cirurgiã-Dentista, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^b Doutora, Professora do Departamento de Odontologia I, Curso de Odontologia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

^c Doutor, Professor do Departamento de Odontologia I, Curso de Odontologia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

Autor para correspondência:

Antonio Luiz Amaral Pereira

Endereço postal: Rua Quéops, Qd. 22, Nº 14. Apto 703. Renascença II. São Luís - MA.
CEP: 65085-040

Telefone: (98) 3227-1979 ; e-mail: alap@ufma.br

Resumo

A resistência de microorganismos aos antifúngicos disponíveis para tratamento de candidíase tem motivado a busca por produtos derivados de plantas com atividade sobre *Candida* spp. Este estudo teve como objetivo avaliar efetividade antifúngica de extratos de *Passiflora edulis*, *Psidium guajava* L., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Orbignya phalerata* Mart. e *Anacardium occidentale* L. sobre *C. albicans* (ATCC90028) e *C. glabrata* (ATCC2001) e sobre biofilme *C. albicans*. Tal atividade foi determinada por difusão em Ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Realizou-se testes em biofilme sobre espécimes de resina acrílica que foram tratados com extrato de *Psidium guajava* (300mg/ml), hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5%, e água destilada. O extrato de *Psidium guajava*, apresentou halos de inibição de 17,08 mm para *C. albicans* e 20,41 mm para *C. glabrata*. A CIM e CFM do mesmo extrato para *C. albicans* foi 15mg/ml e 30mg/ml respectivamente e para *C. glabrata* 3,75mg/ml e 15mg/ml. O efeito do extrato sobre biofilme mostrou uma redução significativa quando comparado ao controle negativo. Concluiu-se que apenas o extrato de *Psidium guajava* apresentou atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, e em biofilme formado sobre espécimes de resina acrílica.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Biofilme; *Candida Albicans*

Abstract

The main etiology of denture stomatitis is the *Candida* biofilms. The microorganism may exhibit antifungal resistance in this way, search for products derived from *Candida* active in plants it is necessary. We analyzed the antifungal activity of *Passiflora edulis* extracts, *Psidium guajava* L., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Orbignya phalerata* Mart. and *Anacardium occidentale* L. on standard strains of *C. albicans* (ATCC90028) and *C. glabrata* (ATCC2001). Such activity was determined by diffusion in Agar, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM), with positive controls chlorhexidine 0.12% and fluconazole 128 mg / ml. He carried out further tests on biofilm acrylic resin specimens. The specimens were treated with sodium hypochlorite (NaOCl) 0.5% for 10 min, *Psidium guajava* 300mg / ml for 15min. and distilled water as negative control (15 min.). Colony forming units (CFU) / mm² expressed the number of viable *Candida* cells .. *Psidium guajava*, showed a 17.08 mm inhibition halos for *C. albicans* and *C. glabrata* 20.41 mm. The MIC and MFC of the same extract to *C. albicans* was 15mg / ml and 30mg / ml respectively and *C. glabrata* 3.75mg / ml and 15mg / ml. The effect of Extract on biofilm showed a significant reduction in CFUs acrylic resin specimens when compared to the negative control. It was concluded in this study that the extract of *Psidium guajava* showed antifungal activity against strains of *C. albicans* and *C. glabrata* and that there was significant reduction of biofilm formed on acrylic resin specimens.

Key words: Medicinal plants; Biofilm; *Candida albicans*

Introdução

A candidíase ou candidose é uma infecção fúngica causada pela proliferação de leveduras do gênero *Cândida*, podendo ser observada principalmente na primeira infância e senescência, sendo que fatores predisponentes sistêmicos ou locais podem atuar favorecendo o aumento dos níveis de *Candida*, dentre eles, os mais comumente envolvidos são: distúrbios endócrinos, prolongada terapia antibiótica, corticoterapia, fatores nutricionais, baixo fluxo salivar, uso de imunossuppressores, doenças que causam imunodeficiência, como a AIDS, próteses removíveis mal adaptadas e higienizadas e lesões em tecidos moles (Akpan; Morgan, 2002; Muzyca, 2005; Saramanayake *et al.*, 2009).

Para o desenvolvimento de infecções é fundamental o crescimento microbiano representado pelo biofilme, uma vez que este serve de nicho aos agentes patogênicos (Kuhn *et al.*, 2002; Salermo *et al.*, 2011). Biofilmes fúngicos, especialmente aqueles do patógeno *C. albicans*, são uma das causas de infecções associadas a dispositivos médicos. Estas infecções podem ser graves, pois as células do biofilme são relativamente resistentes a muitos agentes antifúngicos (Blankenship; Mitchell, 2006).

Quando associada ao uso de próteses, a candidíase é denominada de estomatite sob prótese ou estomatite protética e consiste em uma lesão comumente observada sob a área chapeável da prótese, acometendo cerca de 65% dos usuários de prótese totais superiores. O biofilme de *Candida* formado sobre a base da prótese é considerado o principal fator etiológico da estomatite protética (Mukherjee *et al.*, 2005; Pereira-Cenci *et al.*, 2008).

Os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente dos microrganismos na forma planctônica, no que diz respeito ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas (Flemming, 1993; Mittelman, 1998). Aliado a isto, o uso indiscriminado e prolongado de fármacos industrializados pode acarretar a ocorrência de resistência a antifúngicos convencionais por algumas cepas (Loguercio *et al.*, 2005).

O tratamento da estomatite protética, assim como a prevenção, se dá principalmente, pela eliminação do fator etiológico, que é o biofilme de *Candida*, através de uma adequada higienização da prótese removível. Para tanto, está indicada além da limpeza mecânica, a desinfecção da prótese (Nikawa *et al.*, 1999; Catão *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2011).. Diante disto, a imersão das próteses em soluções químicas para

limpeza torna-se fundamental para manutenção da saúde oral (Nikawa *et al.*, 1999). Tais soluções devem possuir ação solvente, detergente, fungicida e bactericida (Catão *et al.*, 2007), além disso, devem ser de fácil manuseio, baixo custo para incentivar seu uso, terem gosto agradável após o uso, não serem tóxicos ao paciente, serem compatíveis com todos os materiais da prótese, efetivos na remoção de manchas, depósitos orgânicos e inorgânicos não apenas das superfícies polidas, mas, principalmente, das superfícies rugosas que ficam em contato com os tecidos

No caso da persistência da estomatite protética mesmo com a mudança dos hábitos de higiene da prótese, faz-se necessário o emprego de agentes antifúngicos locais ou sistêmicos (Freitas *et al.*, 2011).

Segundo Anibal *et al.*, (2010), apesar do uso da terapia antifúngica no tratamento da estomatite protética, a infecção comumente é restabelecida logo após cesse o tratamento. É de suma importância portanto, o estudo de outros medicamentos eficazes para o tratamento da EP e que tenham menor efeito colateral ao paciente (Paiva *et al.*, 2009). A biodiversidade da flora brasileira e a eficiência na produção de constituintes químicos ativos das plantas em um país tropical como o Brasil tornam mais relevantes a busca por produtos naturais com potencial atividade biológica, capazes de serem empregados clinicamente no tratamento de enfermidades (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Propriedades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais vêm sendo citadas na literatura. Extratos de casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e folhas de *Psidium guajava* L., mostraram em estudo *in vitro* potencial atividade antimicrobiana e antiaderente sobre os microrganismos formadores no biofilme dental, como também demonstraram atividade antifúngica sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade oral (Alves *et al.*, 2009). Mesocarpo do fruto de *Orbignya spp* mostrou-se eficaz contra microrganismos patogênicos, compreendendo uma promissora fonte de fármacos antimicrobianos (Batista, 2008). Agizzio *et al.* (2003) relataram que uma proteína isolada de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* possui atividade antifúngica; Queiroz (1998) testou a ação de extratos de *Anacardium occidentale* (cajueiro) frente a isolados de *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. kruzei* e *C. tropicalis* e observou efeito inibitório frente às leveduras estudadas.

A triagem de extratos vegetais da flora brasileira com atividade antifúngica pode contribuir para identificação de produtos naturais com potente atividade inibitória frente ao biofilme de *Candida*, o que poderá ser útil em trazer subsídios para auxiliar no controle

desses microrganismos no meio bucal (Cavalcanti *et al.*, 2012). Frente a isto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica das espécies vegetais *Passiflora edulis*, *Psidium guajava* L., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Orbignya phalerata* Mart. e *Anacardium occidentale* L. sobre cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC90028) e *Candida glabrata* (ATCC2001), assim como determinar seu efeito no biofilme de *Candida albicans*.

Material e métodos

Delineamento experimental

Trata-se de um estudo, *in vitro*, através do levantamento de dados primários, por meio da avaliação da ação de extratos vegetais (casca de *Schinus terebinthifolius*, mesocarpo de *Orbignya phalerata*, folhas de *Psidium guajava* e *Passiflora edulis*; e folhas e casca de *Anacardium occidentale*), sobre as cepas de microrganismos do tipo *Candida albicans* (ATCC90028) e *Candida glabrata* (ATCC2001). Para isto foram realizados testes de susceptibilidade com avaliação de halos de inibição dos extratos, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método da microdiluição, seguido de subcultivos em ágar para determinação da Concentração Fungicida Mínima. Em seguida foram realizados testes em biofilme de *Candida albicans* (ATCC90028). Para o ensaio em biofilme foram confeccionados espécimes em resina acrílica, divididos aleatoriamente em 3 grupos de tratamento (n=6). Microrganismos aderidos aos espécimes foram removidos das amostras tratadas por vortexação e foi realizada a contagens de UFC por mm² dos espécimes.

Coleta e identificação botânica

Foram realizadas excursões aos locais de cultivo e/ou ocorrência natural do material botânico, em obediência às normas de coleta estabelecidas na literatura (Costa, 1994). Material botânico foi processado no campo, herborizado (Forman; Bridson, 1989) e identificado no herbário da Universidade Federal do Maranhão. As exsiccatas preparadas do material coletado foram identificadas no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão sob as seguintes numerações: *Psidium guajava* L.- n° 1182, *Orbignya phalerata* Mart.- n° 1371, *Anacardium occidentale* L.- n° 1050, *Schinus*

terebinthifolius Raddi- n° 488 e *Passiflora edullis* Sims- n° 1156.

Obtenção dos extratos

Os materiais vegetais (casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi, mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart, folhas de *Passiflora edullis* Sims e de *Psidium guajava* L.; e folhas e casca de *Anacardium occidentale* L.), após etapas de identificação botânica, secagem (em estufa de circulação de ar, em temperatura de 38°C) e moagem (moinho de facas), foram submetidos à extração exaustiva por maceração com etanol a 70%.

As soluções obtidas foram filtradas, acondicionadas em frascos apropriados, concentradas sob pressão reduzida em roto-evaporador e armazenadas até a realização dos ensaios. Os resíduos secos foram diluídos em água destilada na concentração de 100 mg/ml, transferidos para eppendorfs e centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm, em câmara de fluxo laminar e mantidos em frascos estéreis em geladeira, para a realização dos ensaios.

Microrganismos

As cepas de referência utilizadas no estudo foram *Candida albicans* (ATCC90028) e *Candida glabrata* (ATCC2001). As cepas foram reativadas em Caldo Sabouraud-Dextrose (Difco), a 37°C e estocadas em Ágar Sabouraud-Dextrose 4% (Difco).

Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar. Aplicou-se volumes de 25 µL dos extratos na concentração de 100mg/ml, em poços de 5 mm de diâmetro, em placas de Ágar Sabouraud- Dextrose conforme descrito previamente (Ferro *et al.*, 2003).

Para condução do estudo, suspensões fúngicas de *C. albicans* e *C. glabrata* foram reativadas de suas culturas de estoque em SDA e incubadas por 48h a 37°C. A partir daí as células foram colhidas, suspensas em meio Yeast Nitrogen Base (YNB) (Disco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com 100 mM de glucose. A suspensão de células foi padronizada para 10⁶ microrganismos/mL, determinado com auxílio de espectrofotômetro a uma densidade óptica de 0,38 em comprimento de onda de 520 nm (Oliveira *et al.*, 2013).

As suspensões de células foram semeadas nas placas, com auxílio de swab estéril. Os extratos foram depositados e foram utilizados como controles positivos gluconato de clorexidina a 0,12% e fluconazol (128 µg/mL). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas, período após o qual os halos de inibição foram medidos, com auxílio de paquímetro e expressos em milímetros, de acordo com os critérios de interpretação do CLSI (2007).

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

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos foi utilizado o método de microdiluição em caldo. Foram realizadas diluições seriadas dos extratos utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades. Inicialmente, foram distribuídos 160 µL do meio RPMI e 40 µL do extrato com uma concentração inicial de 300.000 µg/ml. Por meio da diluição seriada, foram obtidas concentrações de 60.000 µg/ml à 4.700 µg/ml. Posteriormente, foi inoculado 1 µL da suspensão-padrão de leveduras, inclusive nos poços controle que continham apenas o meio de cultura. A incubação foi feita em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a leitura da placa foi realizada utilizando-se o método da turvação do meio, realizando-se a comparação visual do crescimento da levedura ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas com o seu crescimento no poço-controle positivo (Fluconazol com concentrações variando de 25,6µg/ml a 0,2 µg/ml e clorexidina variando de 240 µg/ml a 1,875 µg/ml. A menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento da levedura foi identificada como a CIM do extrato vegetal (Abraão et al., 2012). Para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), uma alíquota de 10 µl dos poços das diferentes diluições foi semeada, com auxílio de uma alça, sobre a superfície de placa contendo Ágar Sabouraud-Dextrose e incubadas a 37°C por 24h (Lubian et al., 2010). Considerou-se a CFM a menor concentração onde não foi observado crescimento de colônias características, de acordo com os critérios de interpretação do CLSI (2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise do efeito do extrato em biofilme

Preparo dos espécimes

Confeccionou-se espécimes na forma de discos, com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, utilizando-se uma matriz de aço inoxidável. A resina acrílica Lucitone 500 (*Dentsplay, Petrópolis, RJ, Brasil*) foi proporcionada (7g do pó para 3ml do líquido) e processada de acordo com as instruções do fabricante. Os espécimes de resina foram receberam acabamento e polimento com lixa d'água nas granulações de 320, 400 e 600, para padronização da superfície e foram armazenados em água destilada a 37 °C por 48 horas para eliminação do monômero residual (Moura *et al.*, 2006).

Coleta, centrifugação da saliva e formação da película adquirida

Foram selecionados voluntários adultos (idade entre 25 e 35 anos), saudáveis, sem distinção de gênero, que não estivessem fazendo uso de antibióticos ou antissépticos bucais nos últimos três meses. Foi realizada coleta de saliva em jejum, estimulada pela mastigação de papel parafinado Parafilm[®], sempre no mesmo horário, durante todo o experimento para evitar alterações na composição da saliva por conta do ritmo circadiano, a qual foi coletada em tubo de ensaio estéril e mantida em um recipiente com gelo até o processamento. A saliva foi centrifugada (10.000g, 5 min a 4°C) e o sobrenadante foi removido e utilizado imediatamente. Para formação da película adquirida, os espécimes foram posicionados em placas de 24 poços e 2,0 ml dessa saliva clarificada foi pipetada. Os espécimes foram mantidos por 30 minutos em estufa à 37°C para formação completa da película adquirida. Após este período, o espécime foi removido e a saliva foi descartada.

Formação de biofilme

Os ensaios de biofilme foram realizados utilizando-se cepa padrão de *C. albicans* (ATCC90028). Após a formação de película adquirida nos espécimes, 2ml de suspensão padronizada de células (10^6 cel./ml) de *C. albicans* foi adicionado em cada poço.

Os biofilmes foram formados sobre os espécimes previamente descritos, sendo a área da superfície colonizada de cada disco de 141.3mm^2 . Os microrganismos foram incubados a 37° C em estufa de aerobiose por 2h para adesão inicial do biofilme, em seguida os espécimes foram lavados em PBS e colocados em YNB por 72 horas para formação do biofilme. A cada 24h foi realizada a lavagem dos espécimes com PBS e troca do meio.

As análises foram realizadas em dois experimentos independentes.

Tratamento do biofilme

Após o crescimento do biofilme de, os espécimes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de acordo com os diferentes tipos de tratamento:

Grupo 1 (experimental): 1 ml de extrato de *Psidium guajava*, com concentração de 10X a CFM por um tempo de imersão de 15 min.

Grupo 2 (controle positivo): 1 ml de Hipoclorito de sódio a 0,5%, com tempo de imersão de 10 min.

Grupo 3 (controle negativo): 1 ml de água destilada, com tempo de imersão de 15 min.

Quantificação do biofilme

Decorrido o tempo de tratamento, todas as amostras foram gentilmente imersas em PBS. Após a lavagem, cada espécime foi inserido em tubo estéril contendo 3 ml de PBS, até o processamento.

A quantificação do biofilme foi feita por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

A suspensão contendo espécime mais biofilme foi vortexada com pérolas de vidro por 1 minuto. A suspensão foi diluída serialmente até a proporção de 10^{-4} em PBS. A semeadura foi realizada pela deposição de alíquotas (20 μ L) destas diluições em duplicata nas placas. As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 48h. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas em microscópio esteroscópico, e os resultados expressos em número de UFC por área do espécime (UFC/mm²). Amostras foram semeadas em Ágar sangue para todos os grupos a fim de verificar possível contaminação.

Análise estatística

Os halos de inibição e concentração inibitória mínima foram apresentados por medidas descritivas nos grupos de estudo. Quanto ao biofilme, os dados foram analisados pelo programa estatístico Bioestat (versão 5.0), a variável unidade formadora de colônia (UFC) foi sumarizada nos grupos através da média e desvio-padrão. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para aferir a normalidade da distribuição dos dados. Confirmada a normalidade da distribuição dos dados, o teste T de Student independente foi selecionado

para analisar comparativamente a média de UFC entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $\alpha=5\%$.

Resultados

Os valores médios dos halos de inibição dos extratos para os testes realizados com *C. albicans* e *C. glabrata*, estão apresentados na tabela 1. O extrato de *Psidium guajava* mostrou atividade inibitória, juntamente com controles positivos fluconazol e clorexidina. Os demais extratos testados não apresentaram atividade inibitória frente às cepas de *Candida* na concentração testada.

Tabela 1. Halos de inibição para testes em *Candida albicans* e *Candida glabrata*

Diante dos halos obtidos pelo extrato de *Psidium guajava*, procedeu-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2.

A CIM do extrato para *C. albicans* foi de 15mg/ml, enquanto que a CFM foi de 30mg/ml.

Substância	Halos de inibição (mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Fluconazol 128 µg/ml	18,36	18,50
Gluconato de clorexidina 0,12%	16,96	20,75
<i>Psidium guajava</i> L.	17,08	20,41
<i>Orbignya phalerata</i> Mart.	0	0
<i>Anacardium occidentale</i> L. "casca"	0	0
<i>Anacardium occidentale</i> L. "folha"	0	0
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	0	0
<i>Passiflora edullis</i> Sims	0	0

Para *C. glabrata*, obteve-se como CIM do extrato a concentração de 3,75mg/ml e CFM (15mg/ml). O fluconazol não teve efeito fungistático ou fungida nas concentrações

testadas enquanto que a clorexidina foi capaz de inibir o crescimento destes microorganismos (Tabela 2).

Com relação aos controlos negativos houve crescimento do microrganismo em todos os poços para ambos os testes.

Tabela 2. Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) sobre amostras de *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

TRATAMENTO	<i>C. Albicans</i>		<i>C. Glabrata</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Extrato de <i>Psidium guajava</i> (mg/ml)	15	30	3,75	15
Fluconazol (µg/ml)	0,8	12,8	Sem atividade	Sem atividade
Clorexidina (µg/ml)	7,5	7,5	Inibiu todos	Inibiu Todos

A figura 1 representa médias comparativas da UFC/mm² entre os grupos de estudo. Após tratamento, o grupo exposto ao extrato apresentou uma redução significativa ($p = 0,042$) de UFC/mm² em relação ao grupo controle negativo (água). O grupo extrato apresentou UFC médio de 11.660 ± 5.552 , enquanto que o grupo controle negativo (água) 21.674 ± 9.004 .

O grupo Hipoclorito de sódio eliminou todas as células de *Candida*.

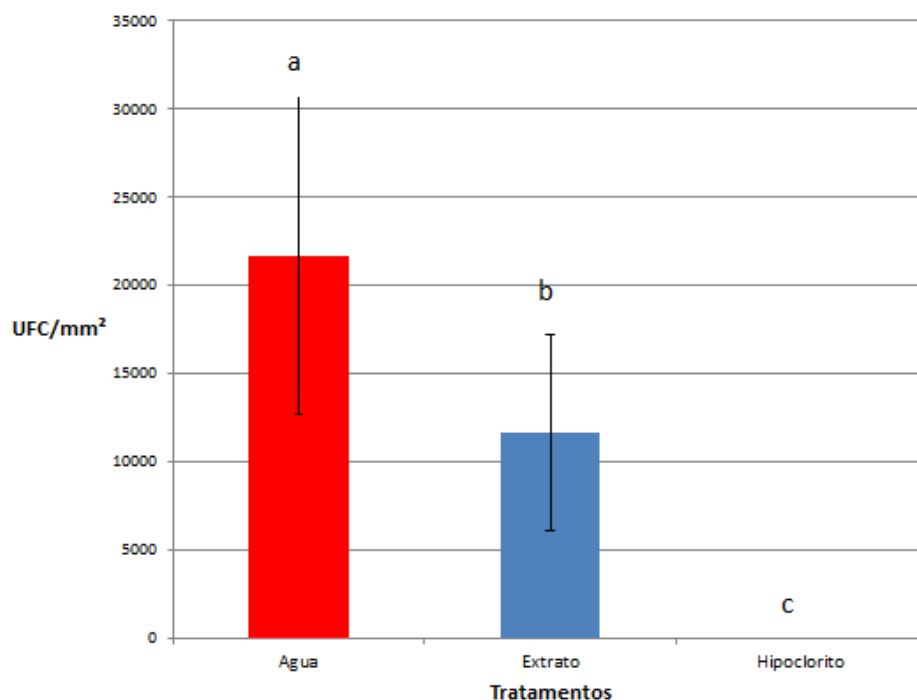


Figura 1. Distribuição de UFC entre os grupos ($P = 0,042$).

Discussão

A capacidade de espécies de *Candida* em formar biofilmes resistentes aos antifúngicos atualmente utilizados tem sido um entrave no tratamento da candidíase. Frente a este fato, existe a necessidade da procura de novos produtos com habilidades antifúngicas eficazes (Sardi et al, 2013). A busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal mostra-se de relevante significância.

A presente pesquisa avaliou a atividade antimicrobiana de extratos vegetais oriundos da flora brasileira sobre patógenos orais. O screening para avaliação da atividade antifúngica dos extratos foi realizado por meio do método de difusão em ágar, baseando-se na evidenciação de halos de inibição. Quando da triagem da atividade antimicrobiana, a literatura tem estabelecido que halos de inibição do crescimento superiores a 8 mm ou 10 mm são indicativo da presença de atividade inibitória (Menezes et al., 2009; Packer, Luz, 2007; Lima et al., 2006). Assim, os resultados do presente trabalho indicam um potencial efeito antifúngico do extrato de *Psidium guajava* (goiabeira) sobre cepas de *C.albicans* e *glabrata*. Com relação à *C.albicans*, este resultado corrobora com os

trabalhos de Pessini *et al.*, (2003), Alves *et al.*, (2006), Alves *et al.*, (2009) Menezes *et al.*, (2009) e Fonseca e Botelho (2010) que também encontraram atividade antifúngica bastante satisfatória do extrato de *Psidium guajava* sobre cepas padrão deste fungo.

Contudo, na literatura científica, não foram encontrados relatos de testes com extratos vegetais de *Psidium guajava* em espécies de *C. glabrata*, evidenciando um diferencial na pesquisa realizada, visto que, *C. glabrata* vem sendo apontada como responsável por 15% das candidíases ocorridas em mucosas e sistemicamente (Cormack *et al.*, 1999).

A importância desses achados está relacionada ao significado clínico destes microrganismos que se encontram em elevada frequência no biofilme das próteses podendo ser deglutidos ou aspirados e levar ao desenvolvimento de graves infecções sistêmicas (Coulthwaite; Verran, 2007).

Os halos de inibição obtidos pelo extrato da folha de *Psidium guajava* foram superiores ao gluconato de clorexidina 0,12% quando testado em cepas de *C. albicans* e superiores ao fluconazol quando testado sob cepas de *C. glabrata*, comprovando sua capacidade e grande eficácia quanto à inibição do crescimento destes patógenos quando testado dentro das condições deste estudo.

O uso indiscriminado e prolongado de fármacos industrializados pode acarretar a ocorrência de resistência de algumas cepas a antifúngicos convencionais, o que estimula o uso de produtos de origem natural como uma importante alternativa no tratamento de infecções fúngicas (Loguercio *et al.*, 2005).

Psidium guajava, é amplamente utilizada na medicina popular e seus extratos e metabólitos, especialmente os de folhas e frutos, possuem atividades farmacológicas úteis. Apresentam propriedades antiespasmódicas e antimicrobianas no tratamento da diarreia e disenteria. Também tem sido amplamente utilizado como agente hipoglicemiante. Há relato de exibir ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (Gutiérrez *et al.*, 2008). Suas folhas apresentam a seguinte composição química: taninos (9-10%), óleo essencial (90,3%) rico em cariofileno, nerolidiol, β -bisaboleno, aromadendreno, p-selinemo, α -pinemo e 1,8-cineol; triterpenóides (ácido oleanólico, ursólico, catecólico, guaiavólico, maslínico), β -sitosterol (Alves *et al.*, 2006). Iha *et al.*, (2008) realizaram ensaios do Análise extrato etanólico de *P. guajava*, empregando cromatografia em camada delgada confirmaram a presença de taninos, possíveis responsáveis pela sua atividade antimicrobiana.

O Fluconazol (FLZ) tem sido o agente antifúngico de escolha no tratamento de infecções por *Candida* spp. sistêmicas ou na mucosa. No entanto, a aquisição de resistência aos compostos azólicos foi observada em vários organismos, em particular *C. albicans* e tem sido um dos principais problemas na terapia antifúngica, visto que, o tratamento pode conduzir à seleção de microrganismos, favorecendo infecções causadas por espécies mais resistentes de *Candida* não-*albicans* (Gomes *et al.*, 2011).

Por outro lado, clorexidina a 0,12%, é um dos agentes antimicrobianos mais estudados e o mais potente, altamente eficaz e em geral utilizada como padrão, com o qual é medida a potência de outros agentes (Torres, 2000). Porém, vários inconvenientes têm sido relatados com a utilização de digluconato de clorexidina para a desinfecção protética. As soluções químicas a base de clorexidina utilizadas para imersão ou em associação ao método de escovação podem alterar a dureza e a rugosidade superficial de algumas resinas acrílicas, também estão associadas à pigmentação dos dentes naturais e artificiais, presença de manchas na língua e sabor desagradável (Pinto *et al.*, 2010).

Os demais extratos avaliados, apesar de apresentarem na literatura pesquisas que demonstrem seus potenciais antimicrobianos e antifúngicos (Queiroz, 1998; Agizzio *et al.*, 2003; Batista, 2008; Alves *et al.*, 2009), não se mostraram eficazes contra cepas de *Candida* nos testes realizados na presente pesquisa. Um importante fator a ser considerado quando se realiza qualquer pesquisa envolvendo plantas medicinais é quanto a fatores ambientais envolvidos no momento da coleta da planta, como sazonalidade, clima, tipo de solo e temperatura do ar, a produção de metabólitos secundários pela planta ocorre em função da interação planta versus ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos, podendo este fato explicar resultados divergentes de extratos da mesma espécie, porém coletado em locais e períodos diferentes (Freitas *et al.*, 2004). Dessa forma, nota-se que há muitas variáveis e o fato de não ter sido verificado resultado positivo para a atividade antifúngica não invalida novos estudos de cunho farmacológico e microbiológico dessas espécies vegetais (Menezes *et al.*, 2009).

Com relação a determinação da CIM e CFM do extrato de *Psidium guajava*, frente a amostras isoladas de *C. albicans* e *C. glabrata*, o resultado obtido por este estudo nos mostra que *C. glabrata* apresentou uma maior sensibilidade ao extrato de *Psidium guajava* quando comparada à *C. albicans*. Fato positivo, pois este microrganismo é naturalmente mais resistente ao tratamento antifúngico e é fortemente associado a infecções sistêmicas generalizadas com alta mortalidade (Gomes *et al.*, 2011).

Outro dado que nos chama a atenção neste estudo diz respeito ao crescimento da *C. glabrata* em todas as diluições do fluconazol o que está em concordância com Gomes *et al.*, (2011) que observaram em seu estudo que *C. glabrata* apresenta maior resistência a este medicamento.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais, avaliada por meio da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste, é um aspecto bastante relevante no que diz respeito à preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (Pinto *et al.*, 2003).

Devido a importância da limpeza química das estruturas protéticas para a redução de espécies de *Candida* e devido à predominância de cepas de *albicans* nestas estruturas, foi avaliado o efeito do extrato bruto de *Psidium guajava* sobre biofilme de *C. albicans* em espécimes de resina acrílica.

O modelo do biofilme apresenta vantagens sobre o modelo de células planctônicas, porque as células do biofilme possuem crescimento diferenciado, apresentam metabolismo alterado devido à alta densidade populacional e, em geral, apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos (Duarte, Rosalen *et al.* 2006).

Apesar de nosso estudo mostrar que houve uma redução significativa de *C. albicans* frente ao extrato quando comparado ao grupo controle negativo, os resultados foram inferiores ao grupo do hipoclorito de sódio a 0,5% que inibiu 100% das cepas em um tempo de 10 min.

No trabalho realizado por Reis *et al.* (2011), foi avaliado o grau de inibição da formação de biofilme e concluiu que os extratos hidroetanólicos das folhas de *Psidium guajava* L. não apresentaram ação inibitória no crescimento e na formação de biofilmes por *C. albicans*. As diferentes regiões de onde advêm as plantas ou as concentrações diferentes dos extratos nos testes, podem justificar a diferença de resultados

Ao relacionarmos os resultados obtidos para o uso do extrato e uso de limpadores químicos, semelhanças foram encontradas na literatura, pois tais limpadores removeram por volta de 50% de cepas de *C. albicans* das resinas, persistindo um biofilme residual, enquanto que, após a utilização do hipoclorito a 0,5%, não houve presença de biofilme residual e todas as células de *Candida* foram eliminadas da resina da base da prótese (Freitas Fernandes *et al.*, 2011).

Apesar de eficaz, estudos têm demonstrado que os limpadores químicos possuem uma ação mais acentuada sobre as bactérias presentes no biofilme, apontando assim para uma potencial seleção de fungos como a *C. albicans*, além disso, seu custo relativamente alto limita muito a adesão dos pacientes ao uso destes produtos, principalmente se incluído na rotina diária de higienização oral (Lucena-Ferreira *et al.*, 2014). Quanto ao hipoclorito de sódio, mesmo diante dos resultados favoráveis, este apresenta desvantagens tais como sabor e odor desagradáveis (Budtz-Jorgensen, 1979; Yilmaz *et al.*, 2005)

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o extrato das folhas de *Psidium guajava* possui importante ação antifúngica, porém, apesar da comprovação da eficácia de tal extrato contra cepas de *Candida*, são necessárias maiores investigações a respeito da sua composição química, toxicidade e mecanismos de ação, bem como avaliações farmacológicas mais abrangentes para um melhor desenvolvimento do seu potencial terapêutico.

Conclusão

Dentro das limitações deste estudo conclui-se que o extrato das folhas de *Psidium guajava* foi eficaz contra cepas de *Candida*. Verificou-se ainda que houve uma redução significativa de UFC/mm² em espécimes de resina acrílica frente ao extrato de *Psidium guajava*, quando comparado ao grupo controle negativo.

Referências

- 1- Abraão, F.Y., et al. 2012. Atividade *in vitro* de fluconazol e itraconazol em biofilmes de *candida albicans*.
- 2- Akpan, A., Morgan, R. 2002. Oral candidiasis. *J Postgrad Med* , v. 78, p.455-459.
- 3- Alves, P.M., et al. 2006. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n. 2, p. 192-196, Abr./Jun.

- 4- Alves, P. M., *et al.* 2009. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Rev Socied Bras Med Trop.*, v. 42, n.2, p.222-224, mar/abr.
- 5- Anibal, P.C., *et al.* 2010. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 824-831.
- 6- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, n.6, p.588-94.
- 7- Cavalcanti, Y.W., *et al.* 2012. Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*. *Rev Bras de Ciências em Saúde*, v.16, n.1, p.43-48.
- 8- Chandra, J., *et al.* 2001. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*, v. 80, p. 903-908.
- 9- CLSI. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, Pennsylvania- USA 19087-1898, v.26, n. 3, 177p.
- 10- Costa, A.F. 1994. *Farmacognosia*. 4^a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. v. II. 1023 p.
- 11- Dunne W.M., *et al.* 2003. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiol Review*, v.15, n.2, p.155-66..
- 12- Freitas Fernandes, F.S. *et al.* 2011. Efficacy of denture cleansers on *Candida spp.* Biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 105, p. 51-58.
- 13- Ferro, V.A., *et al.* 2003. In vitro susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. *Antimicrob Agents Chemother* , v. 47, n.3, p.1137-1139.
- 14- Fonseca, J. F., Botelho A.C.F. 2010. Atividade Antifúngica do Extrato de Folhas de *Psidium guajava* sobre Leveduras do Gênero *Candida*. *Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre*, v. 51, n. 1, p. 24-26, jan./abr.
- 15- Forman, L., Bridson, D. 1989. *The Herbarium Handbook*. Royal Botanic Gardens, Kew. Great Britanic, 214p.
- 16- Freitas, M.S.M., *et al.* 2004. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.6, n.3, p.30-4.

- 17- Gutiérrez, R. M. P., *et al.* 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117 , p. 1–27.
- 18- Gomes, P.N., *et al.* 2011. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Archives of Oral Biology*. 8p.
- 19- Iha, S.M., *et al.* 2008. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.3, p. 387-393, Jul./Set.
- 20- Kuhn, D.M., *et al.* 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 46, n. 6, p. 1773–1780.
- 21- Lima, I.O., *et al.* 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 197-201, Abr./Jun.
- 22- Loguercio C., *et al.* 2005. Beneficial effects of a probiotic on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol*, v. 39, n.6, p. 540-3.
- 23- Lubian C.T., *et al.* 2010. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.12, n. 2, p. 157-162.
- 24- Menezes, T.O.A., *et al.* 2009. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 38, n.3, p.184-91.
- 25- Mittelman, MW. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2760-2764.
- 26- Moreira, M. S. C. *et al.* 2012. Atividade antifúngica de soluções antimicrobianas disponíveis comercialmente e de produtos naturais à base de *Rosmarinus officinalis* (alecrim). *Int J Dent*, Recife, v.11, n.1, p.38-42, jan/mar.
- 27- Moura J.S., *et al.* 2006. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*, v.96, p.205-11.
- 28- Muzyka, B.C. 2005. Oral fungal infections. *Dent Clin North Am.*, v.49, p.49-65.
- 29- Mukherjee P.K., *et al.* 2005. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol*, v. 43, n.3, p. 191-208.
- 30- Nikawa H., *et al.* 1999. A review of *in vitro* and *in vivo* methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*, v.12, p.153-9.

- 31- Oliveira, J. R., *et al.* 2013. Antifungal effect of plant extracts on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Braz Dent Sci*, v. 16, n. 3, Jul/Set.
- 32- Packer, J.F.; Luz, M.M.S. 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras de Farmacognosia*, v. 17, n.1, p. 102-107, Jan./Mar.
- 33- Paiva, L.C.A., *et al.* 2009. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. *Rev Bras de Farmacognosia*, v.19, n.2A, p.423-428, Abr./Jun.
- 34- Pereira-Cenci T., *et al.* 2008. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*, v.53, n.8, p. 755-64.
- 35- Pessini G.L., *et al.* 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn*, v. 13, *Supl. 1*, p.21-24.
- 36- Pinto T.J.A., *et al.* 2003. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.
- 37- Pinto, L.R., *et al.* 2010. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard relined acrylic resins. *Gerontodology*, v. 27, p. 147-53.
- 38- Reis, N.T.P., *et al.* 2011. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a Formação de biofilmes por *Candida albicans*. *Revi da Univers Vale do Rio Verde*, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 337-343, ago./dez.
- 39- Rodríguez-Tudela J.L., *et al.* 1996. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI–2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory standards reference microdilution method M27-P for In vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.40, n.9, p.1998–2003, sept.
- 40- Salerno C., *et al.* 2011. *Candida*-associated denture stomatitis. *Medicina Oral Patología Oral e Cirurgia Bucal*. Valencia, v.16, n.2, p.139-143.
- 41- Samaranayake, L.P., *et al.* 2009. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology 2000*, v. 49, p. 39–59.
- 42- Torres, C.R.G., *et al.* 2000. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol.* São José dos Campos, v.3, n.2, jul./dez.

3 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que há perspectiva de utilização terapêutica do extrato de *P. guajava*, na clínica odontológica, pois seu extrato hidroalcoólico apresentou, *in vitro*, potencial atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* e reduziu significativamente o biofilme de *C. albicans* microrganismos formadores de biofilme dental em resina acrílica quando comparado ao controle negativo.

Diante destes resultados e considerando que a *Psidium guajava* (goiabeira) é de fácil acesso à população e o extrato é de baixo custo, a folha da goiabeira pode ser utilizada como meio alternativo no tratamento da estomatite protética.

Ressalta-se que este estudo representa uma avaliação inicial para determinação da atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava*, sobre biofilmes de *C. albicans*, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de outros ensaios pré-clínicos, que incluam a avaliação da curva de morte microbiana, além do desenvolvimento de estudos sobre o possível mecanismo de ação e propriedades toxicológicas.

Referências

- 1- Akpan, A., Morgan, R. 2002. Oral candidiasis. *J Postgrad Med*, v. 78, p.455-459.
- 2- Agizzio, A.P., *et al.* 2003. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 416, p. 188-195.
- 3- Alves, P. M., *et al.* 2009. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Rev Socied Bras Med Trop.*, v. 42, n.2, p.222-224, mar/abr.
- 4- Anibal, P.C., *et al.* 2010. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 824-831.
- 5- Bagg J., *et al.* 2003. High prevalence of non-*albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med*, v.17, n.6, p. 477-81.

- 6- Batista, Hebert Lima. 2008. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas do estado do Tocantins. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza. 154 f.
- 7- Beck-Sagué, C.; Jarvis, W.R.R. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis.*, v.167, p. 1247-1251.
- 8- Botelho, M.A., *et al.* 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.40, p. 349-356.
- 9- Budtz-Jorgensen E. 1979. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent* n.42, p. 619-23.
- 10- Cavalcanti, Y.W., *et al.* 2012. Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*. *Rev Bras de Ciências em Saúde*, v.16, n.1, p.43-48.
- 11- Chen, S. C.; Sorrell, T. C. 2007. Antifungal agents. *Med J Aust.*, v. 187, p. 404-409.
- 12- Costa A.C., *et al.* 2009. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Braz J. Pharmacogn*, v. 19, n.1B, p. 236-241, Jan/Mar.
- 13- Costa, K.R.C.; Candido, R.C. 2007. Diagnóstico Laboratorial da Candidíase Oral. *NewsLab*. 83 ed., p. 138- 145.
- 14- Coulthwaite , L; Verran, J. 2007. Pathogenic aspects of denture plaque. *British Journal of Biomedical Science*, v. 64, n.4, p. 180-189.
- 15- Donlan, R.M.; Costerton, J.W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2 , p. 167–193, Apr.
- 16- Ferro, V.A., *et al.* 2003. In vitro susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. *Antimicrob Agents Chemother* , v. 47, n.3, p.1137-1139.
- 17- Flemming, H-C. 1993. Biofilms and Environmental Protection. *Water Sci. Technol.* V.27, p.1-10.
- 18- Fonseca, J. F.; Botelho A.C.F. 2010. Atividade Antifúngica do Extrato de Folhas de *Psidium guajava* sobre Leveduras do Gênero *Candida*. *Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre*, v. 51, n. 1, p. 24-26, jan./abr.

- 19- Freitas Fernandes, F.S., *et al.* 2011. Efficacy of denture cleansers on *Candida spp.* Biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 105, n. 1, p. 51-58.
- 20- Freitas, S.A.A., *et al.* 2011. Protocolo de atendimento do paciente com estomatite protética na atenção básica. *Rev Pesq Saúde*, v.12, n.3, p. 43-48, set-dez.
- 21- Holanda, A.A.R., *et al.* 2007. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v.29, n.1, p.3-9.
- 22- Khan, R., *et al.* 2009. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. *Molecules*, v.14, p.586- 597.
- 23- Kuhn, D.M., *et al.* 2002. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 6 , p. 1773–1780, Jun.
- 24- Jose A., *et al.* 2010. Reducing the incidence of denture stomatitis: are denture cleansers sufficient?. *J Prosthodont*, v. 19, n.4, p. 252-7
- 25- Li L., *et al.* 2007. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*, v. 86, n.3, p. 204-15.
- 26- Lubian, C.T., *et al.* 2010 . Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.12, n.2, p.157-162.
- 27- Mittelman, MW. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2760-2764.
- 28- Moreira, M.S.C., *et al.* 2012. Atividade antifúngica de soluções antimicrobianas disponíveis comercialmente e de produtos naturais à base de *Rosmarinus officinalis* (alecrim). *Int J Dent*, Recife, 11(1):38-42, jan/mar.
- 29- Muzyka, B.C. 2005. Oral fungal infections. *Dent Clin North Am.*, v.49, p.49-65.
- 30- Nikawa H., *et al.* 1999. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*, v.12, p.153-9.
- 31- Oliveira *et al.* 2006. Effectiveness of *Lippiasidoides Cham.* (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Review Brazilian Farmacognosy*, v.16. n.4, p.510-516.
- 32- Paiva, L.C.A., *et al.* 2009. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. *Rev Bras de Farmacognosia*, v.19, n.2A, p.423-428, Abr./Jun.

- 33- Paranhos, H.O.F., *et al.* 2007. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *Journal of Oral Rehabilitation*, v.34, p.606–612.
- 34- Pedroso, R. S., *et al.* 2014. Sensibilidade de isolados de *Candida* spp. a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. *Biosci. J.* Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 304-311, Jan./Feb
- 35- Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, v.20, n.1, p. 133-63.
- 36- Queiroz, M.L.F. 1998. Atividade antifúngica *in vitro* de plantas medicinais frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- 37- Rex, J. H.; *et al.* 2000. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, v.30, p. 662-678.
- 38- Ribeiro *et al.* 2009. Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*. *Braz Dent. Sci*, 12 (4): 40-45.
- 39- Salerno C. *et al.* 2011. *Candida*-associated denture stomatitis. *Medicina Oral Patología Oral e Cirurgia Bucal*. Valencia, v.16, n.2, p.139-143.
- 40- Samaranayake, L.P. *et al.* 2009. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology 2000*, v. 49, p. 39–59.
- 41- Sardi, J.C.O., *et al.*,. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 10–24.
- 42- Scalercio, M. *et al.* 2007. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. *RGO*, Porto Alegre, v. 55, n.4, p. 395-398, out./dez.
- 43- Souza R.F., *et al.* 2009. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 4 : CD007395.
- 44- Yilmaz H., *et al.* 2005. Effects of disinfectants on resilient denture-lining materials contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, and *Candida albicans*. *Quintessence Int*, v.36, p.373-81.

Anexo- Normas da Revista Brasileira de Farmacognosia

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo e política editorial

A Revista Brasileira de Farmacognosia (Revista Brasileira de Farmacognosia) é um periódico dedicado à publicação de trabalhos científicos originais, comentários e divulgação no campo da Farmacognosia (estudo de produtos naturais biologicamente ativos).

Artigos Originais (em Português, Inglês ou Espanhol): refere-se a trabalhos de pesquisa inéditos. Eles devem seguir a forma de apresentação de costume, contendo Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho.

Artigos de Revisão (em Português, Inglês ou Espanhol): eles são direcionados para a apresentação do progresso em uma área específica de Farmacognosia, contendo uma visão crítica, com o objetivo principal de beneficiar o grupo formado por pós-graduandos e não-especialistas em a área. Os RBFAR Editores pode, por acaso, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão. É desejável que o autor tenha publicações na área arbitrada.

Artigos de divulgação (em Português, Inglês ou Espanhol): apresentação de algum aspecto ou área de Farmacognosia, escrito de forma didática, com o objetivo de beneficiar o grupo formado por graduar e pós graduandos, não-especialistas na área, farmacêuticos e professores de áreas afins.

Forma e preparação de manuscritos

1. REGRAS GERAIS

1.1 Todos os manuscritos submetidos devem ser inéditos. A apresentação simultânea de manuscritos descrevendo o mesmo trabalho a outras revistas não é aceitável. Os direitos de publicação são reservados, incluindo traduções; posterior publicação é permitido com a citação da fonte.

1.2 A Revista Brasileira de Farmacognosia recebe para publicação trabalhos científicos originais, comentários e artigos de divulgação escritos apenas em Inglês. O conteúdo do texto é de inteira responsabilidade do autor (s), e não refletem, necessariamente, a opinião do Editor, Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial .

1.3 Linguagem de publicação é o Inglês. Os manuscritos escritos por autores cuja língua materna não é o Inglês deve ser verificada por um falante nativo ou um serviço de edição de linguagem profissional antes da apresentação de melhorar o Inglês. Assistência de serviços de edição independentes podem ser encontradas em <http://journalexperts.com?rcode=BJP> . Todos os serviços são pagos e organizados pelo autor, eo uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação.

1.4 A Revista Brasileira de Farmacognosia reserva-se o direito de submeter todos os manuscritos recebidos para consultores ad hoc, cujos nomes serão mantidos em sigilo e que terá a autoridade para decidir sobre a pertinência para a aceitação. Árbitros podem enviar de volta manuscritos de Editor-Chefe para a transmissão ao autor (es) com sugestões de alterações necessárias aos manuscritos que estão a ser feitas, a fim de estar em conformidade com as normas e regras editoriais da revista.

1.5 Toda ideia e conclusão apresentadas em um artigo publicado são de responsabilidade exclusiva do autor (es) e não refletem necessariamente a opinião do Editor, Editores de Seção ou dos membros do Conselho Editorial.

1.6 Cada artigo envolvendo estudos com humanos ou animais devem ter a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que o autor (s) pertencem, autorizando tais estudos.

1.7 Todos os materiais vegetais utilizados na pesquisa descrita devem ser apoiados por uma indicação do site (incluindo coordenadas GPS, se possível) e país de origem, o nome da pessoa que identifica o material de planta e a localização do espécime voucher. Os autores devem estar preparados para fornecer provas documentais de que a aprovação para a coleta foi dada a partir de uma autoridade competente do país de colheita.

1.8 Os seguintes critérios de rejeição imediatas aplicam: i) o manuscrito não cair em uma das áreas de interesse da Revista; ii) o manuscrito é muito preliminar, relatando dados de atividade, sem comparação com uma referência, ou sem um controle positivo; iii) a fonte botânica não seja claramente identificada, autenticado e documentado; iv) estudos experimentais de atividade antimicrobiana e antioxidante com extrato bruto, sem isolamento e identificação de compostos ativos.

2. REGRAS PARA A ELABORAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES

2.1 O (s) autor deve manter uma cópia (eletrônico e papel) do manuscrito submetido, no caso de perda ou dano ao original enviado para a revista.

2.2 As figuras (fotografias, gráficos, desenhos, etc) devem ser apresentados após as referências e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas, e estar localizado abaixo das figuras. A sua posição respectiva no texto deve ser indicada preferencialmente logo após sua citação no corpo do manuscrito.

2.3 Tabelas e gráficos devem ser apresentados após as referências e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As tabelas (dados numéricos) não devem ser fechadas por linhas laterais. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizado acima da tabela. Deve haver uma indicação da posição aproximada no texto onde as tabelas ou gráficos devem ser colocados, preferencialmente, logo após sua citação no corpo do manuscrito.

2.4 As legendas das ilustrações botânicas devem estar de acordo com as regras adotadas pela revista. Solicite as normas a revista@sbfgnosia.org.br .

3. FORMATAÇÃO E CONTEÚDO DO TRABALHO DE TEXTO

3.1 Documentos originais. Artigos originais são artigos de pesquisa descrevendo resultados experimentais originais. O manuscrito deve ser organizado na seguinte ordem: Título, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Figura com Legenda, tabelas, fórmulas estruturais. Resultados e Discussão podem aparecer como duas partes separadas ou como um combinado de "Resultados e Discussão" seção. A duração normal do texto principal de um

artigo original, excluindo referências, tabelas, figuras e legendas de figuras, é de cerca de 3.000 palavras. Em casos excepcionais e devidamente justificados, podem ser aceites manuscritos mais longos. Ao submeter tais manuscritos, os autores devem fornecer uma declaração justificativa, dando razões para o comprimento do papel.

3.2 Comunicação breve: Esta seção irá cobrir principalmente o isolamento de compostos conhecidos a partir de novas fontes neotropicais, ou resultados complementares de um trabalho contínuo. A comunicação deve ser organizada na seguinte ordem: título, resumo de 200 palavras, Palavras, Observações preliminares, Materiais e Métodos com breves detalhes experimentais sem subtítulos, Resultados e Discussão como um corpo de texto sem manchetes, Agradecimentos, Referências até 20 citações, Figura e / ou tabelas de até 3. autores devem limitar o texto, que não deve exceder 2.000 palavras.

3.3 Comentários geralmente serão convidados pelo Editor-Chefe. Eles devem ser o mais conciso possível e não precisa incluir detalhes experimentais. O principal objetivo das revisões é fornecer uma introdução concisa, precisa para o assunto e informar o leitor de forma crítica sobre os últimos desenvolvimentos nesta área.

3.4 Além das orientações, um modelo (para artigos originais) e uma carta de amostra estão disponíveis em www.sbfgnosia.org.br/revista. Autores são convidados a seguir esses formatos ao preparar um manuscrito.

3.5 Os originais deverão ser impressos em papel tamanho A4, usando fonte com espaçamento duplo Times New Roman, tamanho 12, totalmente justificado, e com margens de 2 cm. Eles devem ter um máximo de quinze anos e um mínimo de cinco páginas, incluindo figuras, tabelas e gráficos.

3.6 Título e subtítulo: Eles devem estar de acordo com o conteúdo do artigo, levando em consideração o escopo e objetivos da Revista. Eles devem ser em letras minúsculas, usando fonte Times New Roman tamanho 14 da fonte. Nome da planta deve ser completo, incluindo o nome do autor e da Família de acordo com <http://www.tropicos.org>.

3.7 Autores: Os nomes dos autores devem aparecer abaixo do título, centralizado. O primeiro e o último nome deve aparecer completo, seguido pelas iniciais de todos os outros nomes (por exemplo, Carlos NU Silva ou Carlos N. Ubiratan Silva). No caso de vários autores, seus nomes devem ser separados por vírgulas.

Afiliação 3.8 Autores : Depois de cada nome do autor não deve haver números arábicos sobrescritos, indicando a instituição a que estão filiados. A lista de instituições deve aparecer logo abaixo da lista de autores. O nome do autor principal deve ser identificado com um asterisco sobrescrito indicando o endereço para o qual toda a correspondência deve ser enviada. O endereço eletrônico institucional e telefone do autor principal deve aparecer como uma nota de rodapé na primeira página.

3.9 Resumo: Uma breve e conciso resumo (máximo de 200 palavras) do artigo, tanto no idioma Português e Inglês, destacando a informação mais importante, a metodologia, os resultados e as conclusões. Isto irá permitir que o leitor para avaliar o seu interesse no artigo e, assim, evitar a necessidade de ler o trabalho completo. Para autores fora do Brasil, o resumo em Português será feito pela revista.

3.10 Palavras-chave: Os autores devem identificar um máximo de seis palavras-chave para representar o conteúdo do artigo. Palavras-chave são muito importantes para pesquisas em bases de dados, validando, assim, o artigo. As palavras-chave devem ser separadas por vírgulas.

3.11 Introdução: A introdução deve estabelecer claramente o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências a publicações mais recentes, onde estas revisões foram publicadas e estão disponíveis.

3.12 Material e Métodos: A descrição do material e os métodos utilizados devem ser breves, mas suficientemente clara para possibilitar a compreensão e a reprodutibilidade da obra. Processos e técnicas já publicados, a menos que extensivamente modificado, deve ser referenciado.

3.13 Resultados: Os resultados devem ser apresentados com um mínimo de discussão pessoal ou de interpretação e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinente, devem ser submetidos à análise estatística.

3.14 Discussão: A discussão deve ser restrita ao significado dos dados obtidos e os resultados alcançados, evitando conclusões não com base nelas. Alternativamente, a critério do autor, os Resultados e Discussão poderão ser apresentados em uma seção.

3.15 Agradecimentos: Este é um item opcional e deve aparecer antes das referências.

4. REFERÊNCIAS

A formatação das referências deve ser padronizada em conformidade com os requisitos da revista, conforme descrito:

4.1 As referências dentro do texto: no início da citação: autor em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses, por exemplo, Pereira (1999); no final da citação: autor em caixa baixa e ano, tanto entre parênteses. por exemplo, (Silva, 1999) ou (Silva & Souza, 1998) ou ou (Silva et al., 1999.) (Silva et al., 1995a, b.); citação textual: fornecer também a página, por exemplo, (Silva, 1999, 24 p.)

4.2 As referências devem ser apresentadas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, em letras minúsculas, em ordem crescente de data de publicação. Leve em consideração as seguintes possibilidades:

4.2.1 O artigo de um periódico: Título do periódico em itálico abreviados conforme Chemical Abstracts Index Fonte Serviço (<http://www.cas.org/sent.html>). No caso de a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizado e não é óbvio, o título deve ser citado completo (por exemplo):

. Vargas TOH 1996 Fatores climáticos responsáveis Pela morte de borboletas na Região Sul do Brasil. *Rev. Bras. Assoc. Entomol.* 11 : (100-105).

No caso da revista citada não pode ser facilmente acessível, recomenda-se a apresentar a sua Chemical Abstracts Número, da seguinte forma:

. Qu W, Li J, Wang M 1991 *Estudos químicos sobre HelicteresIsora L. ZhongguoYaokeDaxueXuebao*22 : 203-206 , apud Chemical Abstracts 116: 124855r .

Em uma citação de citação das fontes deve ser mostrada em itálico:

Wax ET 1977 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais brasileiras.. *J Biol Res Braz* 41: 77-82, apud *Nat ProdAbs*23: 588-593, 1978)..

4.2.2 Livro:

. Costa AF 1996 *Farmacognosia* . Lisboa: Fundação CalousteGulbenkian.

4.2.3 Capítulo de livro:

Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária.. In: Goldaman GT (org.). *Uma odontologia nova*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Tese ou dissertação de materiais:

. Lima N 1991 *Influência da Ação dos raios solares germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hoepiana Benth e fazer Mecanismo de Ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais da Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congresso:

Thomas G, Selak M, Henson PM 1996 Estudo da Fração aquosa de extrato etanólico das Folhas de *Cissampelos sympodialis* los neutrófilos humanos. XIV *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patentes:

Devem ser identificados conforme indicado a seguir, sempre que possível o número do Chemical Abstracts Service deve ser informado.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986 glicosídeo flavona Antialérgicos de *Kalanchoe pinnatum*..Jpn. *KokaiTokkyoKoho JP 61118396* ,apud Chemical Abstracts 105: 178423q.

4.2.7 páginas da Internet:

. Taylor L 2000 medicamentos à base de plantas e medicamentos .<http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm> , Acesso em Outubro de 2009.

5. ABREVIATURAS

Unidades será de acordo com o Sistema Internacional (SI), adotado pela Conferência Geral 11 de Pesos e Medidas. Abreviaturas comuns a serem usados são: m metro; ppm partes por milhão; cm centímetro; cpm contagem por minuto; mm milímetro; desintegrações DPM por minuto; mM micrômetro; nm nanômetros; kg quilograma; g grama; mg miligrama; µg microgramas; ng nanograma; DL50 medial dose letal; mL mililitro; LC50 medial concentração letal; µL micro litro; Hz hertz; s segundos; M molar; mínimo de minutos; mM milimolar; h horas; M molar; µM micromolar; SD desvio padrão; N normal; Erro padrão SE; Ci Curie; Valor limite TLV; X significa Ao usar uma palavra que está ou é afirmado ser um termo de propriedade ou marca, os autores devem usar o símbolo ®.