



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA - UEPB
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ÉRIKA REGINA ILDEFONSO SILVA TRAJANO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL FRENTE A *Candida* spp. ISOLADAS DE
INDIVÍDUOS COM CANDIDOSE BUCAL ASSOCIADA AO USO DE PRÓTESE**

**CAMPINA GRANDE – PB
2015**

ÉRIKA REGINA ILDEFONSO SILVA TRAJANO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL FRENTE A *Candida* spp. ISOLADAS DE INDIVÍDUOS COM CANDIDOSE BUCAL ASSOCIADA AO USO DE PRÓTESE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento a exigência para obtenção do Grau de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daliana Queiroga de Castro Gomes

**CAMPINA GRANDE – PB
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

T758a Trajano, Érika Regina Ildefonso Silva.

Atividade antifúngica do linalol frente a *Candida* spp. isoladas de indivíduos com candidose bucal associada ao uso de prótese [manuscrito] / Érika Regina Ildefonso Silva Trajano. - 2015.
36 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Departamento de Odontologia".

1. Candidíase. 2. Fitoterapia. 3. *Candida albicans*. 4. Saúde bucal. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

ÉRIKA REGINA ILDEFONSO SILVA TRAJANO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL FRENTE A *Candida* spp. ISOLADAS DE INDIVÍDUOS COM CANDIDOSE BUCAL ASSOCIADA AO USO DE PRÓTESE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento a exigência para obtenção do Grau de Bacharel em Odontologia.

Aprovado em: 16/06/2015.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Daliana Queiroga de Castro Gomes - UEPB
Orientadora


Profº Drº Ricardo Dias de Castro - UFPB
Examinador


Profª Drª Jozinete Vieira Pereira - UEPB
Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me concedeu forças e oportunidades para a sua realização. Aos meus pais Edmilson e Maria do Carmo, que me proporcionaram os primeiros ensinamentos. A meu esposo Wagner, por todo o amor, companheirismo e paciência, não medindo esforços para que eu conseguisse concluí-lo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por ser essencial em minha vida, por ter me dado o dom da vida, a determinação, a sabedoria e por preencher a minha vida de bênçãos, proporcionando a realização deste sonho, sem ele nada seria possível.

A toda minha família, em especial aos meus pais Edmilson e Maria do Carmo pelo amor e estímulos dados durante esta trajetória, e pelos ensinamentos de vida que me fizeram chegar até aqui, e, em especial, pela educação, e por isso são os responsáveis ao que sou hoje. As minhas irmãs, Elaine e Maria do Socorro, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso e por mais essa vitória.

Ao meu esposo Wagner, por todo amor, apoio e incentivo que me proporcionou durante esses anos, não me deixando desistir nos momentos mais difíceis e me fazendo buscar sempre mais. Agradeço a Deus por ter me dado a graça de tê-lo ao meu lado nesta jornada, comemorando as vitórias e auxiliando nas dificuldades, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

A minha professora e orientadora Dr^a Daliana Queiroga, que me concedeu a oportunidade de estar ao seu lado desenvolvendo este projeto de pesquisa e também pela confiança, pelos seus ensinamentos, conselhos e orientações dispensadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro, por todos os valiosos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e contribuições tão pertinentes durante o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pela confiança e apoio que foi fundamental na concepção deste trabalho.

A Prof^a Dr^a Jozinete Vieira Pereira, agradeço por ter aceitado participar da minha banca. E quero parabenizá-la por toda dedicação e atenção com a qual exerce a docência.

Não poderia deixar de expressar meus agradecimentos a Gabriela Lacet, mestranda da UFPB, por todo conhecimento transmitido sempre unido a muita atenção, paciência e interesse. Agradeço pela sua orientação, críticas e sugestões fundamentais para a concepção deste trabalho.

A minha eterna dupla Moângela Alencar, que compartilhou comigo alegrias, tristezas e ansiedades. Obrigada pela amizade e pelo convívio nesses anos. Também agradeço aos meus amigos de turma, em especial a Lillian Macêdo, Ana Cláudia, Larissa Rodrigues, Niebla Melo e Carlos Alberis, pela companhia e por cada momento vivido na graduação.

Enfim, a todos que diretamente e indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho. O MEU MUITO OBRIGADA!!!

“Este é o dia da vitória de Deus, o
Senhor; que seja para nós um dia
de felicidade e alegria.”
(Salmos 118:24)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma (s)

µL – Microlitro (s)

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

C. albicans – *Candida albicans*

C. krusei – *Candida krusei*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute -

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

DMSO – Dimetil sulfóxido

et al. – *et alii* (e outros, em latim)

g – Grama (s)

h – hora (s)

mg – Miligrama (s)

mL – Mililitro (s)

mm – Milímetros (m)

NUMETROP – Núcleo de Medicina Tropical

O. basilicum – *Ocimum basilicum* L.

TCT – 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

LISTA SÍMBOLOS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

°C - Grau Celsius

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Fitoconstituente testado, linalol..... | 15 |
| Figura 2 – Esquema metodológico da técnica de microdiluição..... | 17 |
| Figura 3 – Ensaio para a confirmação da (CIM), utilizando o corante TCT..... | 17 |
| Figura 4 – Esquema metodológico da determinação da (CFM) e disposição da solução testada na placa de microdiluição..... | 18 |

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Percentuais das principais espécies de fungos identificados após a análise micológica laboratorial.....19

Tabela 2 – Frequências absolutas e percentuais das variáveis relacionadas às características dos pacientes com diagnóstico clínico de Candidose associada ao uso de prótese dentária total.....20

Tabela 3 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do fitoconstituente linalol e nistatina frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* em $\mu\text{g/mL}$21

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 12 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3 | MATERIAIS E METODOS | 13 |
| 3.1 | DELINEAMENTO DO ESTUDO | 13 |
| 3.2 | POSICIONAMENTO ÉTICO DA PESQUISA | 13 |
| 3.3 | CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE | 13 |
| 3.3.1 | Critérios de inclusão | 13 |
| 3.3.2 | Critérios de exclusão | 13 |
| 3.3.3 | Delineamento amostral | 14 |
| 3.4 | DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E ISOLAMENTO DAS CEPAS CLINICAS DE <i>Candida spp</i> | 14 |
| 3.5 | LINALOL | 15 |
| 3.6 | PRODUTO SINTÉTICO | 15 |
| 3.7 | LOCAL DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS | 16 |
| 3.8 | DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) ... | 16 |
| 3.9 | DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .. | 18 |
| 3.10 | ANÁLISE DOS DADOS | 18 |
| 4 | RESULTADOS | 18 |
| 4.1 | TESTE MICOLÓGICO | 18 |
| 4.2 | CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) | 20 |
| 5 | DISCUSSÃO | 21 |
| 6 | CONCLUSÕES | 25 |
| | REFERÊNCIAS | 27 |
| | APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | |
| | APÊNDICE B - Ficha Clínica | |
| | ANEXO - Parecer do Comitê de Ética | |

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO LINALOL FRENTE A *Candida* spp. ISOLADAS DE INDIVÍDUOS COM CANDIDOSE BUCAL ASSOCIADA AO USO DE PRÓTESE

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar, *in vitro*, a susceptibilidade de *Candida* spp. isoladas de indivíduos com diagnóstico clínico de candidose bucal associada ao uso de prótese dentária, frente ao linalol. Amostras biológicas foram coletadas, por meio de um *swab* estéril, na região de mucosa afetada de 12 pacientes que faziam o uso de prótese dentária. Para identificação das colônias de fungos do gênero *Candida*, as amostras foram semeadas em CHOMágar Candida®; depois as placas foram incubadas à temperatura de 36°C em estufa e, após 48 horas, foi realizada a leitura. Após a realização do exame micológico laboratorial, constatou-se o diagnóstico de candidose bucal para cerca de oito pacientes (66,6%). Verificou-se que a espécie de fungo mais prevalente foi *Candida albicans* (37,5%), seguida por *Candida krusei* (25,0%); e *Candida tropicalis* (4,2%). A atividade antifúngica foi realizada por meio da técnica de microdiluição em caldo. Após este teste, a CIM e as duas concentrações anteriores a CIM, bem como os controles positivos, foram subcultivadas em placas de Ágar Sabouraud Dextrose para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os ensaios foram realizados em triplicata e a nistatina foi utilizada como controle positivo em todos os testes. A melhor atividade antifúngica foi observada sobre a *C. tropicalis* onde apresentou a CIM (500 µg/mL), seguida por *C. albicans* CIM (1.000 µg/mL), e *C. krusei* que apresentou sensível a concentração (2.000 µg/mL). Diante das condições estudadas e dos resultados obtidos, conclui-se que as cepas de *Candida* foram susceptíveis ao fitoconstituente linalol.

Palavras-Chave: Candidíase. Fitoterapia. *Candida albicans*. Saúde bucal.

1 INTRODUÇÃO

A candidose bucal, quando ocorre sob prótese total ou parcial removível, é denominada estomatite protética ou candidose eritematosa. É a infecção fúngica que afeta a grande maioria dos usuários de prótese dentária parcial ou total; fatores como: falta de higiene, material da prótese, tempo prolongado de uso e a espécie fúngica envolvida podem favorecer a proliferação da infecção. Em torno de 60% dos usuários de prótese apresentam algum processo inflamatório provocado por fungos do gênero *Candida* (MELO et al, 2013). Outras condições que favorecem significativamente a colonização dessas leveduras na cavidade bucal são, pacientes com diabetes, baixa imunidade do hospedeiro e traumas causados por próteses mal adaptadas (FERREIRA et al, 2012).

Candida albicans é a espécie mais prevalente e de maior patogenicidade entre as espécies envolvidas com o desenvolvimento da candidose bucal. *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* também fazem parte do curso da doença, sendo que a *C. albicans*, representa mais de 80% dos isolados clínicos (CAVALCANTI et al, 2011).

O tratamento da candidose consiste na combinação de antifúngico tópico ou sistêmico, orientação do paciente quanto à higienização da prótese e verificação da necessidade de troca da mesma (SCALERCIO et al, 2007). A nistatina e o miconazol são as drogas de escolha inicial. Caso a terapêutica tópica não apresente resultado, é iniciado o tratamento sistêmico, sendo o fluconazol a droga mais prescrita (PAIVA et al, 2009; CASTRO, 2010). Porém, o uso dos antifúngicos convencionais podem desencadear a ocorrência de alguns fatores indesejáveis como o aparecimento de reações adversas e o aumento da resistência fúngica (ALVES et al, 2006).

Diante da necessidade de ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento da candidose bucal, novos agentes químicos têm sido investigados, incluindo os de origem natural, com objetivo de produção de novos medicamentos que melhorem a qualidade de vida das pessoas, tentando minimizar ao máximo os efeitos colaterais e a resistência dos microrganismos (ALMEIDA et al, 2008, EVANGELISTA, 2013).

O Brasil é um país com a maior diversidade vegetal do mundo, que, aliada ao conhecimento tradicional e a tecnologia capaz de validar cientificamente esse aprendizado, possibilita um grande potencial do país para o desenvolvimento de fitomedicamentos (DANTAS, 2013). As plantas são importantes fontes de compostos biologicamente ativos,

muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos (VIEIRA, 2009).

Em meio a classes de compostos isolados de plantas com propriedades antibacteriana e antifúngicas, os óleos essenciais consistem na forma de apresentação que concentra a maior quantidade de fitoconstituintes com propriedades biológicas ativas, apresentando destacada diversidade em sua composição química, e por apresentar atividade contra um grande número de microrganismos (BRAZÃO, 2012, FREIRE et al, 2014).

O linalol é um fitoconstituente encontrado como componente de óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas, como perila (*Perilla frutescens*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), aroeira (*Pistacia lentiscus*), sendo o constituinte majoritário do óleo de manjeriço (*Ocimum Basilicum* L.). É um álcool insaturado de monoterpeneo muito empregado na indústria de perfumaria, cosmética e culinária, e testado como acaricida, bactericida e fungicida (BLANK et al, 2007, LUZ et al, 2009, BEZERRA et al, 2013).

De acordo com estudos realizados por Bezerra et al (2013), verificou-se que as linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus salivarius* mostraram-se susceptíveis à ação do linalol. Desde modo, observou-se o potencial antibacteriano do linalol, pois este, *in vitro*, inibiu o crescimento dos microrganismos testados, representando uma possível aplicação deste produto na prevenção e tratamento da cárie dentária.

Diante disto, a busca por novos agentes químicos capazes de inibir o desenvolvimento desses microrganismos tem sido impulsionada, devido ao limitado número de antifúngicos disponíveis para o tratamento (CAVALCANTI et al, 2011). Assim, foi propósito desse estudo avaliar o potencial antifúngico do linalol, frente as cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, isoladas da cavidade bucal de indivíduos com diagnóstico de candidose bucal associada ao uso de prótese dentária.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do fitoconstituente linalol frente às cepas de *Candida* spp. isoladas de indivíduos com diagnóstico de candidose bucal associada ao uso de prótese.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de *Candida* spp. na mucosa bucal de indivíduos usuários de prótese dentária;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do linalol frente às cepas de *Candida* spp. de origem clínica;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do linalol frente às cepas de *Candida* spp. de origem clínica.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Segundo Lakatos e Marconi (2010), utilizou-se uma abordagem indutiva, com procedimento comparativo-descritivo e técnica de pesquisa por documentação direta intensiva em laboratório.

3.2 POSICIONAMENTO ÉTICO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob o número do parecer 731.152, CAAE: 32255214.6.0000.5187 (ANEXO). Os indivíduos avaliados assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

3.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.3.1 Critérios de Inclusão

Indivíduos acima de 30 anos de idade; portadores de próteses parciais removíveis e/ou próteses totais e presença de manifestações clínicas de infecção fúngica.

3.3.2 Critérios de exclusão

Indivíduos que estavam realizando tratamento com antimicrobianos tópicos e/ou sistêmicos

3.3.3 Delineamento amostral

A definição do tamanho da amostra foi conduzida por critérios não-probabilístico e estatístico, sendo, portanto, delimitado por conveniência.

Os indivíduos atendidos na clínica-escola do departamento de odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), foram informados de forma verbal sobre os objetivos e a metodologia da pesquisa e, após aceitarem participar de forma voluntária, foram coletadas as informações referentes aos sinais e sintomas da doença, por meio do preenchimento da ficha clínica (APÊNDICE B), sendo respeitado o sigilo referente a estes dados.

3.4 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E ISOLAMENTO DAS CEPAS CLÍNICAS DE *Candida* spp.

No período compreendido entre agosto de 2014 a dezembro de 2014, foram coletadas as amostras de 12 indivíduos que apresentaram diagnóstico clínico, para a candidose bucal associada a prótese. Os sujeitos da pesquisa foram atendidos na clínica-escola da UEPB, referência nas especialidades de estomatologia, patologia e prótese dentária e no tratamento da candidose associada à prótese.

Para o diagnóstico micológico das espécies de *Candida* spp. envolvidas no processo, foi realizada a coleta de material clínico na região afetada, com o auxílio de um *swab* estéril. O mesmo foi inserido na mucosa delicadamente, por meio de movimentos de fricção, em toda a área eritematosa da mucosa palatina e em toda área da prótese, não realizando nenhuma intervenção nos indivíduos.

As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo solução salina (0,85%) e, encaminhadas ao Laboratório de desenvolvimento de medicamentos (LABDEM) da UEPB, onde foram realizados os testes micológicos a fim de descartar e/ou confirmar o diagnóstico clínico de candidose bucal dos sujeitos.

Para a identificação das colônias de fungos do gênero *Candida*, as amostras foram semeadas em meio de cultura CHOMágar *Candida*®. Este meio cromogênico, baseia-se na produção de diferentes pigmentos produzidos por reação enzimática, permitindo a rápida distinção entre as diversas cepas, em que se observam as colônias de levedura com colorações diferentes (MENEZES et al, 2011). Neste meio, observa-se a *C. albicans* como colônia verde; *C. tropicalis* com coloração azul e a *C. krusei* pode ser vista como uma colônia rosa. Depois

de semeadas, as placas foram incubadas à temperatura de 36° C em estufa e, após 48 horas, foi realizada a leitura.

3.5 LINALOL

O linalol, foi obtido na Quinari®, que produz e comercializa óleos essenciais e seus derivados em escala industrial. A indústria forneceu laudo com informações técnicas do produto, apresentando densidade de 0,85 g/mL e lote número 02235. A solução foi preparada no momento de execução dos testes, para alcance da concentração desejada nos testes de sensibilidade. A diluição ocorreu em água destilada esterilizada q.s.p. e foi utilizado o Tween 80 como agente emulsificante (FIGURA 1).



Figura 1. Fituconstituente testado, linalol

3.6 PRODUTO SINTÉTICO

Foi utilizado como controle positivo ou droga padrão a nistatina, adquirida na Sigma-Aldrich (São Paulo), na forma de pó. A solução foi preparada no momento da execução dos testes, para alcance da concentração desejada nos testes de sensibilidade. O DMSO (Dimetil sulfóxido) foi utilizado como solvente no preparo da mesma.

3.7 LOCAL DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

O ensaio para a determinação da atividade antifúngica do fitoconstituente foi realizado no Laboratório de Microbiologia Oral, localizado no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) pertencente ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foram utilizadas, nos testes, cinco diferentes cepas de isolados clínicos, as quais foram identificadas por códigos e selecionadas de acordo com a origem ou local de isolamento: *C. albicans* CA 032 (base de prótese), CA 051 (mucosa); *C. tropicalis* CT 011 (mucosa) e *C. krusei* CK 032 (base de prótese), CK 031 (mucosa), coletadas de pacientes atendidos na clínica-escola da UEPB. As cepas foram mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose – ASD, em ambiente refrigerado.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi determinada por meio da técnica de microdiluição utilizando placas de 96 poços (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). Inicialmente, foi distribuído 100µL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (HIMEDIA®, Mumbai, Índia) nos orifícios da placa. Em seguida, 100 µL da emulsão do linalol foram transferidos para o primeiro poço, a uma concentração inicial de 2.000 µg/mL⁻¹, a qual foi diluída seriamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada, para a cavidade sucessora, por meio de uma diluição seriada em razão de dois, gerando uma concentração final de 15,62 µg/mL⁻¹ (FIGURA 2) (CLSI, 2002).

Nos orifícios de cada coluna, foram dispensadas alíquotas de 100 µL do inóculo preparado em CSD, na concentração de 2,5 x10³ UFC mL⁻¹, correspondente a cada cepa ensaiada. Os testes para determinação da CIM foram realizados em triplicata, e as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. Paralelamente, foram realizados controle da viabilidade das cepas ensaiadas e controle de esterilidade do meio de cultura. Também foi realizado controle positivo utilizando o antifúngico nistatina, considerada droga de escolha na utilização clínica, em concentração inicial de 12,5 µg/mL⁻¹, a qual também foi diluída seriamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada, para a cavidade sucessora, gerando uma concentração final de 0,097 µg/mL⁻¹.

A determinação da CIM foi observada mediante leitura visual, analisando-se a presença ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo das cavidades da placa. Desta

forma, foi considerada como CIM, a menor concentração do produto capaz de produzir inibição visível (ausência de aglomerados de células) sobre o crescimento das cepas de *Candida*.

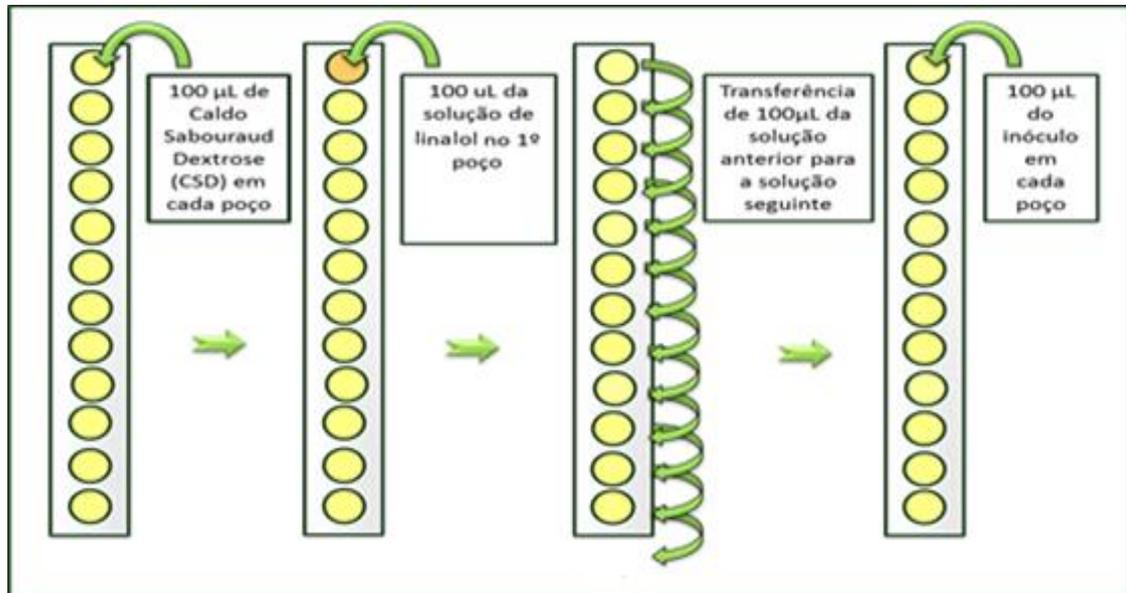


Figura 2. Esquema metodológico da técnica da microdiluição.

Para a confirmação da presença de microrganismos viáveis, foi utilizado o corante TCT (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio), no volume de 50 µL. Esse corante reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular. Com isto, torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas em vermelho, das mortas que mantêm a sua cor (FIGURA 3) (DESWAL; CHAND, 1997).

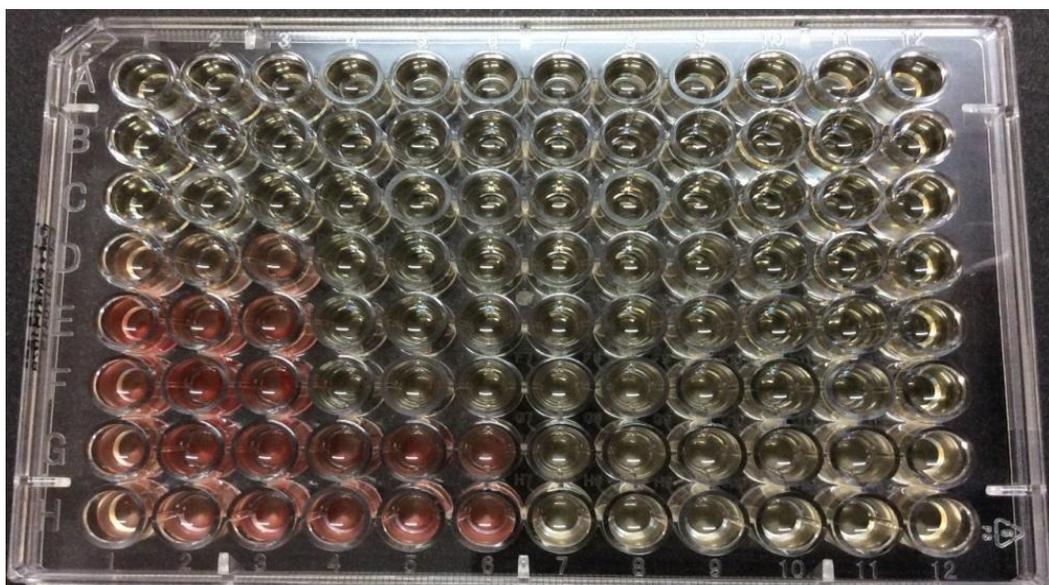


Figura 3. Ensaio para a confirmação da CIM, utilizando o corante TCT.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Após determinação da CIM, alíquotas da concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações anteriores a CIM (CIM, CIMx2 e CIMx4), bem como os controles positivos, foram subcultivadas em placas de ASD. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi realizada a leitura das placas e a CFM definida como a menor concentração do produto que impediu o crescimento visível do subcultivo, ou seja, que foi capaz de eliminar o fungo (CLSI, 2002) (FIGURA 4).

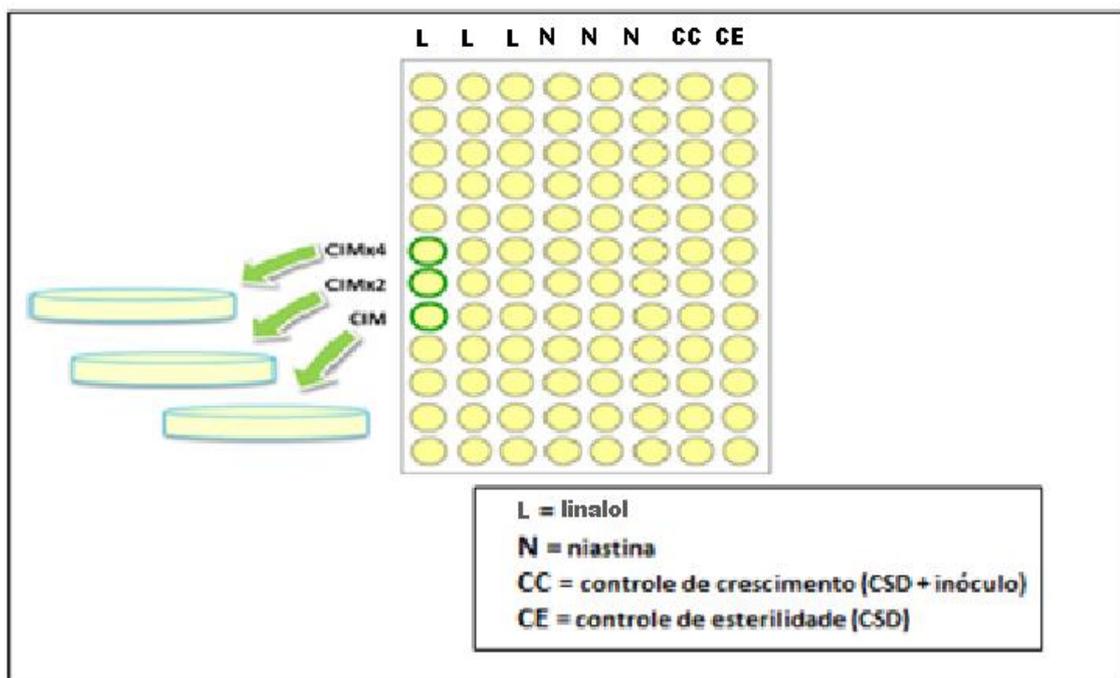


Figura 4. Esquema metodológico da determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e disposição da solução testada na placa de microdiluição.

3.10 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram analisados descritivamente, e os resultados obtidos foram organizados em tabelas.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE MICOLÓGICO

A Tabela 1 descreve as frequências percentuais das principais espécies de fungos identificados após a análise micológica laboratorial. Verificou-se que a espécie fúngica mais identificada foi *C. albicans* (37,5%), seguida por *C. krusei* (25,0%); *C. tropicalis* (4,2%).

Tabela 1. Frequências percentuais das principais espécies de fungos identificados após a análise micológica laboratorial.

| ESPÉCIES FÚNGICAS | % |
|--------------------------|--------------|
| <i>C. albicans</i> | 37,5 |
| <i>C. krusei</i> | 25,0 |
| <i>C. tropicalis</i> | 4,2 |
| Negativo | 33,3 |
| Total | 100,0 |

Durante a realização do presente trabalho, 12 indivíduos apresentaram lesão na mucosa associada ao uso de prótese total. Os resultados obtidos confirmaram oito (66,7%) indivíduos apresentaram diagnóstico micológico positivo para a candidose bucal e quatro (33,3%) negativos. Dos oito indivíduos, sete eram mulheres 87,5%, com a média de idade de 61 anos. Seis (75%), das próteses usadas pelos sujeitos avaliados não apresentavam boa estabilidade e retenção. O uso contínuo das próteses dentárias, mesmo durante o sono, foi relatado por seis indivíduos (75%), fato que contribui para a colonização por leveduras na cavidade bucal. Além disso, cinco indivíduos, correspondendo a 62,5%, apresentaram higiene desfavorável e possuíam sintomatologia dolorosa. Metade da população estudada, quatro (50%), relataram ter diabetes, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Frequências absolutas e percentuais das variáveis relacionadas às características dos indivíduos com diagnóstico clínico de Candidose associada ao uso de prótese dentária.

| VARIÁVEIS | n | % |
|---|----------|----------|
| Sexo | | |
| Feminino | 7 | 87,5 |
| Masculino | 1 | 12,5 |
| Apresenta alguma doença sistêmica | | |
| Diabetes | 1 | 12,5 |
| Hipertensão | 3 | 37,5 |
| Hipertensão e diabetes | 3 | 37,5 |
| Não | 1 | 12,5 |
| Uso contínuo das próteses dentárias | | |
| Sim | 6 | 75,0 |
| Não | 2 | 25,0 |
| Próteses dentárias com estabilidade e retenção | | |
| Sim | 2 | 25,0 |
| Não | 6 | 75,0 |
| Higiene desfavorável | | |
| Sim | 5 | 62,5 |
| Não | 3 | 37,5 |
| Presença de sintomatologia dolorosa | | |
| Sim | 5 | 62,5 |
| Não | 3 | 37,5 |
| Diagnostico laboratorial de Candidose | | |
| Sim | 8 | 66,7 |
| Não | 4 | 33,3 |

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A tabela 3 apresenta os resultados dos testes para a determinação da atividade antifúngica do linalol. A mesma expressa os valores da CIM e CFM do fitoconstituente testado e da nistatina contra as cepas clínicas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. A tabela mostra que o linalol apresenta melhor atividade antifúngica sobre a cepa de *C. tropicalis*.

A nistatina, antifúngico padrão utilizado como controle, apresentou CIM de 0,39 µg/ml, concentração na qual inibiu 100% das cepas.

Tabela 3: Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do fitoconstituente linalol e nistatina frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* em µg/mL.

| MICRORGANISMOS | LINALOL | | NISTATINA | |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | CIM (µg/mL) | CFM (µg/mL) | CIM (µg/mL) | CFM (µg/mL) |
| <i>Candida albicans</i> 032 | 2000 | 2000 | 0,39 | 0,39 |
| <i>Candida albicans</i> 051 | 1000 | 2000 | 0,39 | 0,78 |
| <i>Candida tropicalis</i> 011 | 500 | 500 | 0,39 | 0,39 |
| <i>Candida krusei</i> 032 | 2000 | 2000 | 0,39 | 0,78 |
| <i>Candida krusei</i> 031 | 2000 | 2000 | 0,39 | 0,78 |

5 DISCUSSÃO

A candidose bucal é uma doença frequentemente causada pela *Candida albicans*, comum na cavidade bucal, e presente na microbiota de 50% da população. Lesões são frequentes na mucosa palatina, sob próteses totais ou parciais, apresentando-se inicialmente como pontos hemorrágicos, evoluindo para um eritema associado com edema (BOMFIM et al, 2008).

A candidose não é de fácil tratamento, sendo comum a recidiva após a interrupção da terapia com antifúngicos convencionais. Tendo em vista as limitações dos antifúngicos sintéticos disponíveis atualmente, devido principalmente as reações adversas, resistência fúngica e do pequeno número de drogas disponíveis no mercado, faz-se necessário desenvolver novas estratégias terapêuticas, visando obtenção de uma alternativa ao tratamento (MARTINS, 2009).

A qualidade de saúde bucal da grande maioria da população brasileira ainda está longe do ideal. O levantamento epidemiológico em saúde bucal, realizado no Brasil pelo Ministério da Saúde em 2010, considerou a perda dentária como um dos maiores problemas de saúde bucal da terceira idade. Este levantamento comparou dados de 2003 a 2010, onde revelou que em adolescentes houve uma redução de 30% e em adultos caiu 17% a perda dentária. Entretanto, na população de 65 a 74 anos houve uma diminuição de apenas 1%. Sendo assim,

em 2010 ainda havia mais de 3 milhões de idosos no Brasil necessitando de prótese total nas duas arcadas dentárias e outros 4 milhões precisando usar prótese parcial em umas das arcadas (CARVALHO et al, 2013).

A escolha da metodologia aplicada para identificação das leveduras na cavidade bucal foi direcionada pelo tipo de lesão a ser investigada, pois cada técnica apresenta vantagens e desvantagens (FERREIRA et al, 2012). A técnica de *swab* bucal foi utilizada, pois, além de atender às necessidades da pesquisa, é uma técnica de fácil aceitação pelos indivíduos, apresenta baixo custo, é rápida e prática.

A *C. albicans* é a principal espécie envolvida em processos inflamatórios associados ao uso de prótese dentária, apresentando uma prevalência de 32%, em relação a outras espécies do gênero *Candida* (MELO et al, 2013). O que corrobora com os dados do presente trabalho, uma vez que o mesmo apresenta uma maior prevalência da *C. albicans* de 37,5%, seguida por *C. krusei* (25,0%); *C. tropicalis* (4,2%). De acordo com Menezes (2008), a presença desse fungo não é necessariamente indicativa de doença, pois pode ser isolada em cerca de 40% de indivíduos saudáveis. Porém, em certas condições como, baixa imunidade do hospedeiro, diabetes, uso de prótese e a falta de higiene, esses fungos podem comportar-se como patógenos oportunistas originando infecções como a candidose eritematosa.

Atualmente espécies de *Candida* não-*albicans* vem apresentando maior importância na etiologia das infecções fúngicas, principalmente quanto ao problema da resistência fúngica. Preocupações com o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais têm aumentado, e a realização de estudos de vigilância da resistência antifúngica tem ocorrido frequentemente. Espécies como *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol, ao passo que outras espécies, como *C. tropicalis* e *C. glabrata* têm apresentado crescente resistência adquirida (ABRANTES et al, 2013).

Quanto ao sexo, verificou-se que maioria dos indivíduos com o diagnóstico micológico positivo é mulher (87,5%), com a média de idade de 61 anos. Este resultado condiz com o estudo de Melo et al (2013), em que a prevalência de mulheres com candidose foi de 66,7%, com idade média de 61,3 anos, ainda de acordo com o autor, a candidose associada a prótese é mais frequente em mulheres do que em homens, acima dos 40 anos, devido a diminuição na produção de hormônios, e com isso possa estar associada à maior predisposição em desenvolver lesões da mucosa bucal relacionadas ao uso de prótese dentária.

Segundo Arnaud et al (2012), este fato também pode ser justificado devido à maior procura aos serviços de Saúde por indivíduos do sexo feminino favorecendo o diagnóstico,

como também supõe que mulheres utilizam as próteses dentárias por mais tempo, inclusive o uso noturno por questões estéticas, favorecendo a ocorrência da lesão.

Os indivíduos com diabetes mellitus estão mais propensos a desenvolver infecções na cavidade bucal. A susceptibilidade para infecções bucais, a exemplo da candidose, é favorecida pela hiperglicemia, diminuição do fluxo salivar e alterações na composição da saliva (ALVES et al, 2006, STRAMANDINOLI et al, 2010, MASCARENHAS et al, 2011). Os resultados desse estudo corroboram com essa observação, já que o número de indivíduos acometidos por esta doença foi elevado (50%). Neste caso, dos oito indivíduos com diagnóstico positivo, quatro relataram possuir diabetes, representando uma alta prevalência da doença entre os indivíduos, com diagnóstico de candidose.

Quanto à frequência de uso das próteses, apenas dois (25%) dos indivíduos afirmaram utilizar a mesma somente durante o dia, a maior parte dos entrevistados, seis (75%) informaram permanecer com a prótese mesmo durante o sono, ou seja, fator que pode ter contribuído significativamente para o aparecimento da lesão nos indivíduos. Tais achados são semelhantes ao estudo desenvolvido por Bomfim et al (2008), onde 71,2% dos indivíduos avaliados dormiam com a prótese.

Os pacientes devem ser orientados a remover a prótese durante o sono. O relaxamento e descanso dos tecidos, bem como a ação de limpeza exercida pela saliva, língua e bochechas são fundamentais para a higidez da mucosa bucal (MELO et al, 2013).

No presente estudo, 75% das próteses utilizadas pelos indivíduos, não apresentaram uma boa estabilidade e retenção. De acordo com Mascarenhas et al (2011) e Melo et al (2013), os tecidos da boca sofrem alterações em decorrência do uso constante da prótese, as quais devem ser acompanhadas por um profissional capacitado. O não acompanhamento pode resultar em próteses mal adaptadas que provocam desconforto, dores e lesões que podem favorecer o surgimento de condições patológicas na cavidade bucal e exacerbando a ação patogênica dos microrganismos.

Dos oito indivíduos com candidose, cinco (62,5%) apresentaram sinais e sintomas como petéquias hemorrágicas, dor, sensação de queimação, prurido, halitose e xerostomia. De acordo com Mascarenhas et al, (2011), notificaram que a candidose pode ser acompanhada de sintomatologia dolorosa, apresentando condição variável de eritema e petéquias hemorrágicas, localizadas na área das bordas de próteses superiores.

O linalol é um constituinte químico de grande valor no mercado de cosméticos e perfumaria. Tem sido largamente testado como acaricida, bactericida e fungicida. Na

medicina tem sido aplicado com sucesso, como sedativo e anticonvulsivo (BLANK et al, 2007).

Os resultados do presente estudo mostraram que o linalol, apresentou atividade antifúngica frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, em todos os testes realizados. Os valores de CIM obtiveram resultados diferentes entre as cepas em teste. Porém, a *C. tropicalis*, apresentou a menor concentração inibitória, estabelecida em 500 µg/mL, seguida por *C. albicans* em 1.000 µg/mL e 2.000 µg/mL para *C. krusei*. Desde modo, observou-se que o linalol apresentou grande potencial de inibição sobre o crescimento da *C. tropicalis*.

A atividade biológica do produto foi interpretada, por meio da CIM, conforme os seguintes critérios adotados por Dantas (2013), que: a atividade biológica de um produto pode ser interpretada quando, a CIM variando de 50 a 500 µg/mL, é considerado como sendo de atividade excelente/ótima. Já compostos que apresentam uma variação na CIM de 600 a 1500 µg/mL, como atividade moderada, e maior que 1500 como atividade fraca. Logo, de acordo com esses parâmetros citados pelo autor, pode-se afirmar que neste estudo, o linalol, apresentou atividade antimicrobiana considerada ótima para as cepas de *C. tropicalis*, como também de atividade moderada frente as espécies de *C. albicans*.

Na literatura consultada não há dados relacionados a estudos *in vitro* que abordam as propriedades antifúngicas do linalol frente as espécies do gênero *Candida*. Portanto, o presente estudo é pioneiro, em pesquisar a susceptibilidades de diferentes cepas clínicas de *Candida*, frente ao linalol.

No entanto, estudos tem demonstrado que o linalol possui atividade antibacteriana, como observado em estudos de Bezerra et al (2013), que avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do linalol frente as espécies bacterianas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus salivarius*. Foi utilizada a metodologia de difusão em meio sólido. Observaram que o linalol, apresentou uma boa atividade antimicrobiana, com halos de inibição variando de 8.0 mm a 9.0 mm para as espécies bacterianas em teste.

Para todas as espécies em teste, a CFM apresentou o mesmo valor que a CIM. Com exceção da *C. albicans* coletada de mucosa. Este resultado sugere que a substância é fungicida, pois a mesma concentração que inibiu o crescimento visível do fungo, também foi capaz de eliminar o fungo.

O fato da escolha de amostras clínicas, se baseia na necessidade de dados referentes a estas amostras, visto que a literatura utiliza mais cepas padrão para ensaios microbiológicos. Portanto, não foram identificados estudos que reportassem o efeito inibitório do fitoconstituente linalol sobre a espécie do gênero *Candida*, especialmente em *C. tropicalis*, a

qual foi a espécie de *Candida* mais sensível ao produto em teste. Assim, justifica-se a continuação de novos estudos para investigação de sua ação antifúngica, devido à escassez de estudos sobre a atividade deste fitoconstituente.

A variabilidade genética entre diferentes espécies clínicas de *Candida*, assim como a possibilidade de existirem formas de resistência adquiridas pelas espécies decorrentes dos desafios apresentados pelo meio bucal e/ou contato prévio com antifúngicos, geram algumas diferenças de abordagem e discussões dos resultados, mas devem ser vistas como avanço na literatura científica, visto que o estudo de cepas isoladas clinicamente reflete melhor a realidade.

A partir desses resultados, deduz-se que o linalol representa uma nova possibilidade entre os produtos naturais com atividade antifúngica contra a espécie clínicas do gênero *Candida*. Todavia, faz-se necessário a realização de estudos posteriores, acerca do seu mecanismo de ação e toxicidade, objetivando uma possível aplicação terapêutica.

FINANCIAMENTO: A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

6 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo, observou-se que:

A *Candida albicans* foi à espécie mais prevalente, seguida por *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Foi possível concluir que as cepas de *Candida* envolvidas neste estudo foram susceptíveis ao linalol. No entanto, a melhor atividade antifúngica foi observada sobre a *Candida tropicalis*.

Para todas as espécies em teste, a CFM apresentou o mesmo valor que a CIM. Com exceção da *C. albicans* coletada de mucosa. Este resultado sugere que a substância é fungicida, pois a mesma concentração que inibiu o crescimento visível do fungo, também foi capaz de eliminar o fungo.

Linalool ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FRONT *Candida* spp. ISOLATED INDIVIDUALS WITH ORAL candidiasis ASSOCIATED WITH IMPLANT USE

ABSTRACT

This study evaluated in vitro susceptibility of *Candida* spp. isolated from patients with clinical diagnosis of oral candidiasis associated with the use of dental prosthesis, opposite the linalool. Biological samples were collected through a sterile swab in the mucous region affected in 12 patients who were using dental prosthesis. To identify the fungi of the genus *Candida* colonies, samples were sown in CHOMágar *Candida*®; then the plates were incubated at 36 ° C in an oven and after 48 hours, the reading was performed. After completion of the laboratory mycological examination, there was a diagnosis of oral candidiasis for about eight patients (66.6%). It was found that the most prevalent species of fungus was *Candida albicans* (37.5%), followed by *Candida krusei* (25.0%); and *Candida tropicalis* (4.2%). The antifungal activity was performed using the broth microdilution technique. After this test, the MIC and the two concentrations above the MIC, as well as the positive controls were subcultured on Sabouraud dextrose agar plates to determine the Minimum Fungicidal Concentration (MFC). Assays were performed in triplicate and nystatin was used as a positive control in all tests. The best antifungal activity was observed on *C. tropicalis* which showed the MIC (500 ug / ml), followed by *C. albicans* MIC (1.000 mg / mL), and *C. krusei* which showed appreciable concentration (2.000 mg / mL) . On the studied conditions and the results obtained, it is concluded that the *Candida* strains were susceptible to fitoconstituente linalool.

Key-words: Candidiasis. Herbal Medicine. *Candida albicans*. Oral health.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, M. R. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras de *Candida não-albicans*. **Rev. Bras. Farm.** v.94, n.3, p.227-233, 2013.
- ALMEIDA, R. B. A. et al., Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf against *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP.** v. 37, n.2, p. 147-153. 2008.
- ARNAUD, R. R. et al., Estomatite Protética: Prevalência e Correlação Com Idade e Gênero. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde.** v.16, n. 1, p. 59-62. 2012.
- ALVES, P. M. et al., Atividade antifúngica do extrato de *Psidiumguajava* 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. 2006.
- BEZERRA, L. M. D. et al, Atividade Antibacteriana *in Vitro* de Fitoconstituintes Sobre Micorganismos do Biofilme Dentário. **Rev. Brasileira de Ciências da Saúde** v.17, n.1, p. 79-84, 2013.
- BOMFIM, I. P. R. et al. Prevalência de Lesões de Mucosa Bucal em Pacientes Portadores de Prótese Dentária. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.** João Pessoa, vol. 8, n.1, p.117-121, 2008.
- BRAZÃO, M. A. B. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, dilapil, frente a *Staphylococcus app.* Multirresistentes.** 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.
- CARVALHO, G. F. P. at al. Prevalência de perdas dentárias em pacientes com mais de 50 anos da clínica odontológica da Universidade Gama Filho. **Rev. Unimep.** v.23, n.2, p.9-16, 2013.
- CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Ciannamomum Zeylanicumblume* (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre as espécies de *Candida*.** 2010. 168 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- CAVALCANTI, Y. W. et al. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev. Odontol Bras Central.** v.20, p. 68-73. 2011.
- CAVALCANTI, Y.W. et al. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. **Rev. Odontol UNESP.** Araraquara, v. 40, n. 5, p. 208-214, set./out., 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocol M27-A2. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 2. ed. Pennsylvania: NCCLS, 2002. 51p.

DANTAS, T.B. **Atividade antifúngica *in vitro* de timol sobre cepas do gênero *Penicillium***. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2013.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* T.) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 409-417, 1997.

EVANGELISTA, S. S. et al., Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.15, n.4, p.513-519, 2013.

FERREIRA, T. N et al., Determinação da prevalência e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes usuários de prótese dentária. **VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**. Paraná, 2012.

FREIRE, I. C. M. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus aureus*. **Rev. Bras. Pl. Med**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 372-377, 2014.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Fundamentos de metodologia científica**. 7 ed. São Paulo: Atlas, 2010. 320 p.

LUZ, J. M. Q. et al, Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjerição sob doses de cama de frango. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 349-353, 2009.

MARTINS, I. M. C. L. **Avaliação da ação antifúngica de *Citrus Limon* Linn. Frente a levedura do gênero *Candida***. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico bucal). Universidades Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

MASCARENHAS, T. P. et al. Lesões bucais associadas ao uso de prótese total. **Rev. Saúde.com**. v. 7, n, 2, p 133-142, 2011.

MELO, I. A et al., Avaliação da incidência de *Candida* spp. associadas ao uso de prótese parcial ou total e perfil dos pacientes atendidos pela clínica odontológica de uma Faculdade em Araguaína-to. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.6, n.2, Pub.5, Abril, 2013.

MENEZES, T. O. A., **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas presentes na região Amazônica sobre cepa de *Candida Albicans***. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

MENEZES, E. A. et al. Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *Candida* spp. Em meio cromógeno: Resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no Ceará. **Rev. De Patologia Tropical**. v. 40, n.4, p. 297-303. Out/dez. 2011.

PAIVA, L. C. A. et al., Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**. 19 (2): 423-428. Abr./Jun. 2009.

SCALERCIO, M. et al. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. **RGO**, Porto Alegre, v. 55, n. 4, p. 395-398, out/dez. 2007.

STRAMANDINOLI, R. T et al., Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **Rev. Sul-Bras Odontol.** Paraná v.7, n.1, p. 66-72. Mar. 2010.

BLANK, A. F. et al, Novas Cultivares Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. **Rev. Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, dez. 2007.

VIEIRA, P. R. N. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente as cepas de *Candida spp.* E *Microsporum canis*.** 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado Ciências veterinária) – Universidade Estadual do Ceará, 2009, Fortaleza, 2009.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE

Prezado (a) Senhor (a),

Esta pesquisa intitulada de **“Avaliar a atividade antifúngica do fitoconstituente linalol frente às cepas de *Candida spp.* isoladas de pacientes com diagnóstico de candidose bucal associada ao uso de prótese”**, trata-se sobre a avaliação da atividade anti-*Candida* de um produto natural sobre espécies obtidas da boca de pacientes com estomatite protética, uma doença da mucosa bucal caracterizada por uma inflamação da região do “céu” da boca. Essa doença pode estar relacionada à má higiene bucal, prótese mal adaptada, não remoção da prótese à noite, e principalmente a infecções causadas por fungos presentes na boca. A pesquisa está sendo desenvolvida por Érika Regina Ildefonso Silva, vinculada ao Curso de Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, sob supervisão da Prof.^a Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, professora do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba. O principal objetivo do estudo é avaliar, em laboratório, se os produtos naturais testados são capazes de eliminar os fungos presentes na doença. A finalidade deste trabalho é contribuir para a busca e desenvolvimento de novas alternativas de tratamento para a candidose oral e estomatite protética através de produtos naturais. Dessa forma, solicitamos a sua colaboração para submeter-se a um exame bucal e laboratorial através da coleta de material da superfície da mucosa bucal, utilizando um cotonete especial. Caso venha a ocorrer algum tipo de incômodo durante a coleta dos dados, os pesquisadores suspenderão os procedimentos e estarão à disposição para ajudá-lo (a). Uma vez diagnosticada a Estomatite protética associada à *Candida*, será prescrito medicamento para solução do problema. Solicitamos também a sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicá-los em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis para a sua saúde, mediante o benefício do tratamento. Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pela pesquisadora. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição onde o estudo está sendo realizado. Os

pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido (a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Impressão digital

Assinatura da Testemunha

Contato com o Pesquisador (a) Responsável: Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para os pesquisadores:

Daliana Queiroga de Castro Gomes. Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) Endereço: Av. Rodrigues Alves, 1125, Apt. 603, Bela Vista, CEP. 58.101-290. Campina Grande – PB. Telefone: (83) 9602-3553. E-mail: dqcgomes@hotmail.com

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - Campus I – UEPB:
Rua Baraúnas, 351 - Bairro Universitário - Campina Grande-PB, CEP 58429-500.

APÊNDICE B

FICHA CLÍNICA (DIAGNÓSTICO CLÍNICO)

Anamnese

1. Data de nascimento:
2. Sexo:
3. Endereço:
4. Telefone:
5. Idade:
6. Alergia a algum medicamento: () Sim, Qual? _____ () Não
7. Doenças sistêmicas:
 - () Hipertensão () Aids
 - () Hipotensão () Insuficiência renal
 - () Diabetes () Câncer
8. Terapia medicamentosa: _____
9. Higiene oral e da prótese: () Favorável () Desfavorável

Inspeção da prótese

1. Tempo de desdentado:
2. Número de próteses utilizadas:
3. Idade da prótese:
4. Uso contínuo: () Sim () Não
5. Apresenta retenção e estabilidade: () Sim () Não
6. Alteração de cor: () Sim () Não
7. Superfície rugosa: () Sim () Não
8. Presença de câmara de sucção: () Sim () Não

Inspeção da área de suporte da prótese

1. Presença de alteração de cor: () Sim. Intensidade:____ () Não
2. Alteração da textura da mucosa: () Sim. Intensidade____ () Não
3. Presença de placas esbranquiçadas susceptíveis à remoção por raspagem:
() Sim. Intensidade () Não
4. Mucosa subjacente eritematosa:
() Sim. Intensidade:____ () Não
5. Sintomático: () Sim () Não
6. Em caso afirmativo, quais são os sintomas:
() dor. Intensidade____
() queimação. Intensidade____
() prurido. Intensidade____
() halitose. Intensidade_____

Diagnóstico

1. Diagnóstico clínico de candidose: () Positivo () Negativo
2. Diagnóstico laboratorial de candidose: () Positivo () Negativo

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Prof.ª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DO RELATOR: (X)

Número do parecer: 32255214.6.0000.5187

Data da relatoria: 10 de julho de 2014

Apresentação do Projeto:

O Projeto é intitulado “Susceptibilidade de *Candida* spp. Isoladas de paciente com Candidose Bucal associada ao uso de prótese frente a um enxaguatório a base de produtos naturais.”

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo geral: avaliar in vitro a susceptibilidade de cepas de *Candida* spp. isoladas de pacientes com diagnóstico de candidose bucal associada ao uso de prótese dentária, frente a um enxaguatório a base de produtos naturais contendo *Calêndula officinallis*, *Lippia sidoides*, *Anacardium occidentale*, *Stryphnodendrom adstrigens* e a Própolis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Considerando a justificativa e os aportes teóricos e metodologia apresentados no presente projeto, e ainda considerando a relevância do estudo as quais são explícitas suas possíveis contribuições, percebe-se que a mesma não trará riscos aos sujeitos a serem pesquisados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Os participantes da pesquisa receberão orientações referentes à saúde bucal e higienização da prótese. O estudo também contribuirá para o fortalecimento de uma linha de pesquisa em saúde no uso de produtos a base de extratos naturais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos encontram-se anexados.

Recomendações: Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências. **Situação do parecer: Aprovado**