



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS – PB



ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon* Linneo
FRENTE A MICRORGANISMOS ORAIS

NATALY DO NASCIMENTO SIMÕES

PATOS-PARAÍBA

2012

NATALY DO NASCIMENTO SIMÕES

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon* Linneo
FRENTE A MICRORGANISMOS ORAIS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de
Campina Grande, Campus de Patos, para a obtenção
do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. M.Sc. Cyntia Helena Pereira de
Carvalho

PATOS-PARAÍBA

2012



Biblioteca Setorial do CDSA. Agosto de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CAMPUS DE PATOS - PB

S593a

2012

Simões, Nataly do Nascimento

Análise da composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Citrus limon* Linneo frente a microrganismos orais / Nataly do Nascimento Simões - Patos - PB: UFCG/UACB, 2012.

48f.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientadora: Cyntia Helena Pereira de Carvalho

(Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas).

Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 - Microbiologia – Monografia. 2 – Óleos essenciais – 3 - Atividades antimicrobiana. 4 – Limão. I - Título

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS – PB



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon* Linneo FRENTE A MICRORGANISMOS
ORAIS

NATALY DO NASCIMENTO SIMÕES

ORIENTADORA: Prof. M.Sc. CYNTHIA HELENA PEREIRA DE CARVALHO

Monografia aprovada em 23/10/2012 como parte das exigências para à obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas pela Comissão Examinadora composta por:

Prof. M.Sc. CYNTHIA HELENA PEREIRA DE CARVALHO (UACB/UFCG)

Orientadora

Prof. Dr. FELÍCIO GARINO JUNIOR (HV/UFCG)

1º Examinador

Prof. Dr. VICENTE QUEIROGA NETO (UACB/UFCG)

2º Examinador

Patos (PB), 23 de outubro de 2012

Dedico

A Deus, pela realização deste trabalho.
A minha família, em especial aos meus pais, Nhara e Alexandre pelo o amor
e apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder forças e discernimento diante as dificuldades encontradas.

Aos meus pais, **Nhara e Alexandre**, por não se contentaram e revestiram minha existência de dignidade, dedicação e amor incondicional.

A minha **Família**, os quais sempre me apoiaram em todas as adversidades desta vida.

Aos meus avós, **Maria das Dores, Pedro, Elsa e Geraldo**, pelo o amor e felicidade de estarem ao meu lado.

A **José Anderson de Lucena Brito e Família**, que me acolheram e apoiaram em vários momentos.

Aos **meus amigos de turma**, pelo companheirismo e dos dias inesquecíveis dessa fase de nossas vidas.

Aos **meus amigos**, em especial, Aline, Rayanne, Joanny, Gina, Heloísa, que sempre acreditaram em mim e que me deram forças sempre que precisei.

Aos **docentes**, empenhados em transmitir conhecimentos e por todo auxílio.

A minha orientadora, **Profa. M.Sc. Cyntia Helena Pereira de Carvalho**, pelo apoio, auxílio e compreensão na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Felício Garino Junior** pela orientação, convívio e aprendizado imenso que tive ao longo deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Vicente Queiroga Neto**, pelas oportunidades e orientações tantas vezes solicitadas, e pela realização da análise do óleo essencial.

A **Profa. Doutoranda Rosália Severo de Medeiros** pela atenção e ajuda, principalmente no início deste caminho.

Ao **Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário**, pelo espaço cedido para realização deste trabalho.

Aos **companheiros de laboratório**, Ramon, Rodrigo, Gina, Layze, Meire, Karla, pela paciência e estimada colaboração na realização deste trabalho.

Ao Diretor do CSTR, **Paulo de Melo Bastos**, que sempre apoiou o curso de Ciências Biológicas e a cada ajuda concedida.

As **Escolas**, Colégio Monteiro Lobato, Educandário N. Sr^a. de Lourdes, Centro Educacional N. Sr^a. da Luz e Colégio Objetivo, por fazerem parte da minha vida e terem sido a base e o início do meu aprendizado.

Aos **funcionários da UACB/UFCG**, por todo apoio e dedicação.

Ao **Programa de Monitoria da UFCG**, pela concessão de bolsa de monitoria e aprimoramento dos meus conhecimentos.

A **CAPES**, pela concessão de bolsa de estudos no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência (PIBID).

"Não inventei a penicilina, a natureza é que a fez. Eu só a descobri por acaso."

Alexander Fleming

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de *C. limon*.

31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – *Citrus limon* Linneo, Bananeiras, Paraíba, 2012. 18
- Figura 2 – Aparelho Clevenger, Patos, Paraíba, 2012. 26
- Figura 3 – Amostra da cepa *S. mutans*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, CLO – Disco de clorafenicol, T – Disco com 5 µL de Tween 80, AC – Disco com 20 µL de “água de cheiro” e OE – Disco com 20 µL de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. 34
- Figura 4 – Amostra da cepa *S. sobrinus*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, CLO – Disco de clorafenicol, T – Disco com 5 µL de Tween 80, AC – Disco com 20 µL de “água de cheiro” e OE – Disco com 20 µL de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. 34
- Figura 5 – Amostra da cepa *S. sanguis*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, CLO – Disco de clorafenicol, T – Disco com 5 µL de Tween 80, AC – Disco com 20 µL de “água de cheiro” e OE – Disco com 20 µL de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. 35
- Figura 6 – Amostra da cepa *C. Krusei*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, A – Disco com 5 µL de Anfotericina B, AC – Disco com 20 µL de “água de cheiro”, OE5 – Disco com 5 µL de óleo essencial, OE10 – Disco com 10 µL de óleo essencial e OE20 – Disco com 20 µL de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. 37
- Figura 7 – Amostra da cepa *C. parapsilosis*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, A – Disco com 5 µL de Anfotericina B, AC – Disco com 20 µL de “água de cheiro”, OE5 – Disco com 5 µL de óleo essencial, OE10 – Disco com 10 µL de óleo essencial e OE20 – Disco com 20 µL de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. 37

SIMÕES, Nataly do Nascimento. **Análise da composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Citrus limon* Linneo frente a microrganismos orais.** 2012. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos - PB, 2012.

RESUMO

O limão (*Citrus limon* Linneo) é uma planta nativa do Sudeste Asiático cultivada em todas as regiões do mundo. O óleo extraído da casca do fruto é utilizado para fins terapêuticos, na culinária, na indústria de alimentos e cosmética, e tem despertado interesse de pesquisadores de todo o mundo. O objetivo desse estudo foi identificar os constituintes químicos do óleo essencial e avaliar *in vitro* sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos da cavidade oral - *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. A extração do óleo essencial foi realizada através do processo de hidrodestilação utilizando Clevenger. O óleo sem coloração apresentou densidade relativa de 0,8388 e índice de refração de 1,467. A análise da composição química realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-MS) identificou 21 compostos, sendo em concentração majoritária o limoneno (63,22%), 1,4-ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletil) - (13,20%) e 1,6-Octadieno-3-ol, 3,7-dimetil- (7,97%). A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial, realizadas em metodologia de difusão em placas, evidenciou resistências das cepas de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e atividade inibitória das cepas de *C. krusei* e *C. parapsilosis*, com halo de inibição superior a 10 mm. Conclui-se que o óleo essencial do *Citrus Limon* ofereceu uma atividade antifúngica o que sugere o uso dessa substância como meio alternativo e economicamente viável para o controle de candidoses.

Palavras-chave: limão, óleo essencial, limoneno, atividade antimicrobiana, estreptococos orais, *Candida*

SIMÕES, Nataly do Nascimento. **Analysis of the chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Citrus limon* Linneo against oral microorganisms.** 2012. Monography (Graduation in of Biological Sciences) - Federal University of Campina Grande, Patos - PB, 2012.

ABSTRACT

The lemon (*Citrus limon* Linneo) is a plant native to Southeast Asia cultivated in all regions of the world. The oil extracted from the rind of the fruit is used for therapeutic purposes, in cooking, cosmetics and food industry, and has attracted interest from researchers around the world. The aim of this study was to identify the chemical constituents of the essential oil and evaluate *in vitro* their antimicrobial activity against microorganisms of the oral cavity - *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis*. The essential oil extraction was done through the process of hydrodistillation using Clevenger. The oil presented colorless, a relative density of 0.8388 and a refractive index of 1.467. The analysis of chemical composition performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) identified 21 compounds being the limonene concentration (63.22%), 1,4-cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl) - (13.20%) and 1,6-octadiene-3-ol, 3,7-dimethyl-(7.97%) the majority. The evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of essential oil, showed resistant strains of *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* to the oil and inhibitory activity against strains of *C. krusei* and *C. parapsilosis*, with a zone of inhibition greater than 10 mm. It was concluded that essential oil of the *Citrus Limon* offered antifungal activity that suggests the use of these substances as an economic and viable kind of alternative to the control of candidosis.

Keywords: lemon, essential oil, limonene, antimicrobial activity, oral streptococci, *Candida*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 Óleos essenciais	15
3.1.1 <i>Citrus limon</i> Linn	17
3.2 Microrganismos orais	19
3.2.1 Gênero <i>Streptococcus</i>	20
3.2.2 Gênero <i>Candida</i>	22
4 MATERIAL E METÓDOS	25
4.1 Material botânico	25
4.2 Óleo essencial	25
4.3 Microrganismos	26
4.4 Análises microbiológicas	27
4.4.1 Bactérias	27
4.4.1.1 Meio de cultura	27
4.4.1.2 Preparo e padronização das diferentes concentrações	27
4.4.1.3. Difusão em placas (screening)	27
4.4.2 Fungos	28
4.4.2.1 Meio de cultura	28
4.4.2.2 Preparo e padronização das diferentes concentrações	28
4.4.2.3 Difusão em placas (screening)	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Análise dos componentes do óleo essencial	30
5.2 Análise da difusão em placas (screening)	32
5.2.1 Bactérias	32
5.2.2 Fungos	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Calcula-se que cerca de 100 trilhões de microrganismos alberguem nosso corpo, compreendendo desde a pele, superfícies dentárias e mucosas que entram em contato com o meio externo (DE LORENZO, 2010). Das regiões anatômicas anteriormente citadas, a cavidade oral é um sítio bem particular do corpo, em função da sua complexidade anatômica, ela não possui uma única espécie e sim uma microbiota complexa com diferenças marcantes em sua composição qualitativa e quantitativa, pois a cavidade oral é composta por vários sítios ecológicos, cada qual com sua microbiota peculiar. (HÄGG et al., 2004; PRIETO-PRIETO; CALVO, 2004; AAS et al., 2005).

Grande parte das doenças que acometem a cavidade oral é de origem infecciosa. Dependendo de fatores, tais como a dieta e a remoção mecânica regular do biofilme dental, o tipo de microbiota predominante na cavidade oral pode variar. Quando a remoção mecânica do biofilme é deficiente e a utilização da sacarose é frequente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e o biofilme se torna virulento, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro quanto de tecido mole. Todavia, deve-se lembrar das dificuldades em se conseguir que os pacientes mantenham um adequado controle mecânico; logo, substâncias antimicrobianas poderiam tentar compensar a desmotivação para uma boa higienização dos dentes (DE LORENZO, 2010).

Como alternativa, o estudo de compostos e extratos naturais tem sido realizado, visando à obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem a prevenção e tratamento de doenças bucais, com poucos efeitos colaterais indesejáveis e fácil acesso à população (PEREIRA, 2005; BOTELHO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; LUSTOSA et al., 2008; SILVA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

A diversidade da vegetação brasileira, resultado das adaptações dos organismos às amplas variações nas condições edafoclimáticas do país, representa uma reserva potencial de novos fitoquímicos bioativos. Dentre os compostos vegetais mais pesquisados destacam-se os óleos essenciais. Estes são também denominados “óleos voláteis”, compostos oleosos aromáticos, de composição complexa contendo dentre outros componentes, hidrocarbonetos terpênicos, ésteres, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e fenóis, em concentrações variáveis

em dependência de diversos fatores, sendo que a composição majoritária é representada por um composto farmacologicamente ativo (BURT, 2007).

Algumas plantas evoluíram produzindo produtos secundários que interagem com alvos moleculares (ex. receptores) de organismos competidores como microrganismos, outras plantas e animais. Nesse sentido, alguns produtos secundários exercem suas funções pela semelhança com metabólitos endógenos, receptores, hormônios, moléculas da transdução de sinais ou neurotransmissores, e por isso possuem efeito benéfico nos homens graças a sua similaridade com moléculas do sistema nervoso central, sistema endócrino (BRISKIN, 2000). Na medicina tradicional, muitos óleos essenciais têm apresentado atividade antimicrobiana, inseticida, no tratamento de doenças cardiovasculares e cancerígenas. Muitos óleos essenciais têm sido empregados como medicamentos complementares no tratamento de infecções fúngicas e bacterianas (HAMMER; CARSON; RILEY, 1998).

Embora seja planta nativa da região do Sudeste Asiático, *Citrus limon* Linneo, o limão é cultivado em todas as regiões do mundo e utilizado na culinária, nas indústrias de alimentos e perfumes, na agricultura e na medicina. O óleo essencial do limão é composto por água, proteínas, gorduras, vitaminas A, B1, B2, B5, C, potássio, sódio, fosforo, ferro, cálcio, enxofre, cloro, silício e magnésio. Seu princípio ativo está na hesperidina, aurantina e limonina. Estudos científicos comprovam que o óleo essencial do limão tem ações antissépticas e antimicrobianas (PEREIRA et al., 2009).

O crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dentário (NAVARRO et al., 1996). Desta forma, a busca por recursos alternativos já é uma realidade, visto as vantagens expostas, justifica a necessidade de se estudar a ação de fitoterápicos sobre os microrganismos orais formadores do biofilme dental e assim, dentro desse contexto, o estudo do *Citrus limon* L. frente microrganismos orais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial, do *Citrus limon* Linneo frente a microrganismos orais.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial e a “água de cheiro” do *Citrus limon* L., o limão, através do processo de hidrodestilação;
- Determinar a composição química do óleo essencial através da cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG-MS);
- Averiguar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e da “água de cheiro” frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Óleos essenciais

O uso terapêutico das plantas medicinais é um dos pontos mais característicos da espécie humana, tão antigo quanto à própria humanidade e encontrado praticamente em todas as civilizações e grupos culturais conhecidos (RODRIGUES, 2007).

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

Os óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, orgânicos, lipofílicos, voláteis, aromáticos, também sendo conhecidos, como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. São extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes (ARAÚJO, 2009).

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

propriedades antifúngicas e 35%, propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006; TRAJANO, 2008). Devido a sua complexa composição, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de várias drogas (SANTOS, 1997).

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

O mecanismo pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito microbiano é pela sua atividade na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando as proteínas. Mais especificamente, atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática por íons de hidrogênio e potássio. A alteração dos gradientes de íons conduz à deterioração dos processos essenciais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN, 2000).

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

3.1.1 *Citrus limon* Linneo

Citrus limon, limão siciliano, é o fruto do limoeiro, árvore da família Rutaceae, que é originário da região sudeste da Ásia. A família Rutaceae possui cerca de 150 gêneros e 2000 espécies, amplamente distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Este possui as seguintes sinónimas: *Citrus limonelloides*, *Citrus medica* var. *limon*, *Citrus limonum*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*, *Citrus limon* var. *rajahmudri*, *Citrus limonia* var. *digitata*, *Citrus limonia* var. *limetta* (BELLETTI et al., 2004; LUZIA; JORGE, 2009).

O óleo essencial de *C. limon* possui, em sua composição, numerosos componentes que podem atuar de maneira isolada ou em associação, sendo, assim, responsáveis por sua maior ou menor atividade biológica. São eles: monoterpenos (α -thujene, α e β -pineno, canfeno, mirceno, α e β -felandreno, α e γ -terpinene, limoneno, terpinoleno, β -ocimeno, p-cimeno, 3-careno); monoterpenos oxigenados (hidrato de sabineno, linalol, endo-fenchol, cânfora, citronelol, borneol, terpin, α -perilla álcool, terpineol, nerol, neral, carvona, geraniol, geranial, citronelol, cadineno, timol); sesquiterpenos (σ -elemeno, E-caryophellene, α -trans-bergamoteno, α -humuleno, E- β -farneseno, γ -curcumeno, valencene, biciclogermacreno, α -muurolene, α e γ -bisaboleno); sesquiterpenos oxigenados (álcool caryophellene, germacreno, α -muurolol, α -cadinol, α -bisabolol, E-farnesol); e outros componentes oxigenados, como o ácido linoléico (FERHAT et al., 2007; LOTA et al., 2002).

Tendo o citral, citronelal, linalol, limonina, pineno, terpineno e limoneno como constituintes químicos do óleo essencial, componentes responsáveis por suas propriedades farmacológicas observadas, tais como: antioxidante, anti-inflamatórias, antiparasitária, analgésica, antimicrobiana, anticancerígena e antiviral (GARCIA et al., 1997; LUZIA; JORGE, 2009; LIMA et al., 2006; SÁ et al., 1996; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais extraídos de limão e citronela, e de alguns componentes dos óleos essenciais citral, geraniol, citronelol e citronelal foram testados em quatro fungos patogênicos (*Candida albicans*, *Microsporum gypseum*, *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus niger*), sendo que o óleo de limão apresentou alta atividade antifúngica para todos

os organismos testados e o óleo de citronela foi eficiente para *Microsporium gypse* (DHARMENDRA et al, 2001).

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

Em microrganismos da cavidade oral, o uso terapêutico de *Citrus limon* pode-se mostrar de grande valia, tendo-se em conta suas diversas ações – antisséptica, antimicrobiana, anti-inflamatória - motivando ainda mais as pesquisas a seu respeito. Entretanto, tomando-se a importância clínica das infecções fúngicas na cavidade oral, é plenamente justificável o estudo da ação antimicótica dos princípios ativos dessa planta, bem como seu uso consciente, a fim de instituir um protocolo de uso seguro (FRANÇA et al., 2008). Oliveira et al. (2007) constataram em seu trabalho o uso de *C. limon* para o tratamento de afecções bucais na forma de infuso, utilizando o fruto maduro para tal fim. Eles também relatam que, embora esta e outras plantas venham sendo submetidas a alguns ensaios na área de Odontologia, ainda faltam estudos científicos que comprovem o seu uso efetivo nas afecções orais. Devido a todo o referencial encontrado em relação às propriedades do óleo essencial do *Citrus limon*, este foi escolhido para realização do estudo.



Figura 1 - *Citrus limon* Linneo, Bananeiras, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor

3.2 Microrganismos orais

De todos os sítios do corpo humano, a cavidade oral é aquele que apresenta os maiores níveis e diversidade de microrganismos. As características anatomo-fisiológicas da boca são responsáveis por esta diversidade, uma vez que a boca apresenta diferentes tipos de tecidos e estruturas que variam quanto à tensão de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, temperatura e exposição aos fatores imunológicos do hospedeiro. Além das superfícies moles e descamativas das mucosas, há superfícies rígidas não descamáveis (estáveis) que são as superfícies dos dentes. As superfícies das mucosas e dentes são ainda banhadas pela saliva ou pelo fluido crevicular (do grego, *crevis*=sulco). O fluido crevicular é o exsudato dos líquidos teciduais/plasma que atinge o sulco gengival. Os diversos nichos da cavidade oral oferecem, portanto, condições favoráveis às exigências nutritivas, respiratórias e de aderência necessárias à colonização de grande variedade de microrganismos. Além disto, fatores comportamentais (ex., dieta e hábitos de higiene oral) e condições de saúde do próprio hospedeiro (ex., fluxo salivar e condições do sistema imunológico), exercem também grande influência nas comunidades bacterianas da boca (DE LORENZO, 2010).

Os microrganismos que colonizam os dentes formam a chamada placa dental bacteriana, de enorme interesse à odontologia e outras áreas de medicina. A placa dental bacteriana é um BIOFILME. Na natureza existem inúmeros biofilmes distintos e a placa dental é possivelmente o biofilme mais estudado, sendo importante no desenvolvimento das principais patologias orais (DE LORENZO, 2010).

O biofilme dental assim formado é composto por um grupo heterogêneo de microrganismos nos diferentes sítios e tende a se estabilizar com o passar do tempo. Essa homeostase bacteriana resulta de um processo dinâmico nas interações microbianas (MARSH, 2005) e a atividade metabólica causa flutuações de pH até mesmo em condições de repouso. Tais flutuações de pH causam alterações no fluido do biofilme, resultando em um distúrbio no equilíbrio na interface dente e biofilme, levando a intermitente perda e ganho de minerais na superfície dental (MANJI et al., 1991). O processo de desmineralização dental só ocorre na presença de microrganismos (LEITES, 2006).

3.2.1 Gênero *Streptococcus*

São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, microaerófilos, acidogênicos e acidúricos, e capazes de formar polissacarídeos extracelulares (LEITES et al., 2006).

Os estreptococos estão distribuídos na natureza como comensais (animais). Os estreptococos causam uma série de enfermidades nos animais e no homem, sendo importantes saprófitos do leite e produtos lácteos. As espécies potencialmente patogênicas ou não patogênicas estão presentes na pele e mucosas do trato digestivo, genital e respiratório, podendo sob determinadas condições, causar doença (KATHRYN et al., 1999).

A virulência dos estreptococos está baseada na secreção de proteínas de superfície e nas estruturas que direta ou indiretamente impedem a fagocitose, incluindo àquelas envolvidas na adesão e metabolismo de carboidratos ou induzindo a liberação de citocinas pro-inflamatórias. Os fatores de virulência mais conhecidos nos estreptococos são a cápsula de ácido hialurônico, a proteína M antifagocitária e as exotoxinas pirogênicas. Outras moléculas incluindo estreptolisinas, proteases, toxinas leucocidas, ativadores plasminogênio (estreptoquinase) e possivelmente receptores da plasmina encontrados na superfície ou secretados contribuem com a patogenicidade. Além disso, a maioria dos estreptococcus patogênicos possui a habilidade de ligar-se ao plasma do hospedeiro; à albumina, à imunoglobulina, ao fibrinogênio; ligar-se à fibrinectina, à laminina e a outros componentes do hospedeiro (KATHRYN et al., 1999).

Existem muitos estreptococos na microbiota oral, dentre eles recebe destaque os *Streptococcus mitis* e o *Streptococcus sanguis*, pois são consideradas colonizadores primários, ligando-se ao dente e iniciando o processo de formação do biofilme dental. A presença do *Streptococcus mutans* e do *Streptococcus sobrinus*, é mais prevalente nas etapas iniciais da cárie (BUISCHI, 2000).

O *Streptococcus mutans* tem sido considerado a principal espécie bacteriana envolvida no processo de formação do biofilme cariogênico. O único habitat natural conhecido de *S. mutans* é a superfície dentária. Os glucanos produzidos por essas bactérias facilitam a aderência e o acúmulo de microrganismos, estabelecendo uma matriz extracelular resistente às forças mecânicas normais de remoção presentes no hospedeiro, e proporcionando alguma

proteção contra os sistemas de defesas específico e não-específico (CANETTIERI et al., 2006; SOUZA et al., 2001). Produzem polissacarídeos extracelulares (glicanos solúveis e insolúveis em água e frutanos) e intracelulares. Produzem ácidos de vários carboidratos. Apresentam um de três antígenos polissacarídeos c, e ou f (JORGE, 2007).

O *Streptococcus sobrinus* foi considerada a espécie mais acidogênica, sendo capaz de produzir ácido mais rapidamente a partir da glicose, e sustentar a produção de ácidos especialmente em valores de baixo pH (SOET et al., 1991). O hábitat é a superfície dentária humana, sendo cariogênico para animais experimentais; pode estar associados à carie humana. Produzem polissacarídeos extracelulares glicanos e ácidos de vários carboidratos. Possuem um de dois antígenos polissacarídeos d ou g (JORGE, 2007).

O *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentam potencial cariogênico em humanos. As outras espécies são encontradas em animais e, se estão presentes em humanos, não parecem ser altamente cariogênicas (MALTZ, 2000).

O *Streptococcus sanguis* são isolados de biofilme dentário, constituem parte significativa da microbiota. Ocorrem em menor número em outras partes da boca (JORGE, 2007). *S. sanguis* é um dos estreptococos predominantes que colonizam os dentes. Algumas amostras dessas espécies tem cariogenicidade mínima para animais, mas a maioria não apresenta tal característica. As lesões de cárie produzidas por *S. sanguis* ocorrem principalmente em sulcos e são significativamente menores que as produzidas por estreptococos do grupo mutans. *S. sanguis* tem sido isolados em todos os biofilmes dentários examinados e também na língua, sendo dificilmente encontrada na garganta. Algumas cepas são α -hemolíticas, mas outras são β e não hemolíticas. A maioria produz polissacarídeo extracelular glicano. Produz ácido a partir da glicose, sacarose e trealose (DAHLÉN, 1993). Produzem polissacarídeos extracelulares e ácidos de vários carboidratos e IgA protease. São divididos em biótipos 1-3 ou 1-4, de acordo com diferentes autores (JORGE, 2007).

3.2.2 Gênero *Candida*

Os fungos, seres eucariontes, heterotróficos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, solo, animais, alimentos. Suas espécies sofrem em sua incidência variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outras (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

No organismo do hospedeiro, em condições normais, os fungos comportam-se de forma não-patogênica. No entanto, em situações de imunossupressão ou alterações sistêmicas, alguns assumem o comportamento de patógenos, causando manifestações infecciosas, que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (BUDTZ-JORGENSEN, 1990). Assim, são denominados fungos oportunistas, que podem ser classificados em filamentosos e leveduriformes. Os primeiros, quando dispersos pelo ar, podem ser deglutidos ou implantados traumáticamente em hospedeiros susceptíveis, iniciando a infecção. Já as leveduras usualmente são colonizadoras da pele, do trato gastrointestinal e de mucosas, vivendo como organismos comensais, e deste grupo fazem parte os representantes do gênero *Candida*. Os fungos leveduriformes são mais resistentes do que os do tipo filamentoso (FARIAS; LIMA, 2000; LACAZ et al., 2002).

Primariamente são observados pela sua forma vegetativa. Sendo esta, unicelular como são conhecidas as leveduras, ou multicelular, caso dos filamentosos (mais abundantes na natureza). Ainda existem os dimórficos, ou seja, podem apresentar-se leveduriformes a temperatura de 37-39°C ou filamentosos a temperatura ambiente (SIDRIM & MOREIRA, 1999). As leveduras têm como estrutura primária, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral, de forma arredondada. Estas células são esporos de origem assexual e se denominam blastoconídios. Alguns gêneros de leveduras menos importantes na micologia médica, reproduzem-se por fissão (MIDLEY, 1998; LARONE, 2000).

A identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* segue alguns critérios básicos como: a produção de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras; fermentação de carboidratos e assimilação de açúcares (LACAZ et al., 2002). Podem-se diferenciar as espécies de *Candida* através da produção de tubo germinativo, utilização das fontes de carbono e de nitrogênio, exigências nutricionais para o cultivo, crescimento a altas temperaturas e suscetibilidade das leveduras frente à cicloheximida (LACAZ et al., 1980; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

As principais espécies dentro do gênero são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. Krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. curvata*, *C. lambica*, *C. famata*, *C. rugosa* e *C. humicola* (LACAZ et al., 1980; RIPPON, 1988; KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992; SIDRIM & MOREIRA, 1999); porém a espécie envolvida na maioria dos casos de candidíase em mamíferos é reconhecidamente *C. albicans*, entretanto espécies não-albicans, tem apresentado crescente importância nos quadros clínicos (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; SIDRIM & MOREIRA, 1999; ZIARRUSTA, 2002).

Após a multiplicação e invasão dos tecidos, as leveduras do gênero *Candida* podem provocar lesões superficiais em pele e mucosas, assim como se disseminar para diferentes órgãos como rins, pulmão, coração, articulações, ossos e sistema nervoso central. A candidíase apresenta diversas manifestações clínicas de caráter subagudo, agudo ou crônico, que podem ser agrupadas em três formas: cutâneo-mucosa, sistêmica ou visceral, alérgica (SIDRIM & MOREIRA, 1999; LACAZ et al., 2002). As mucosas oral, vaginal e esofágica são as mais acometidas em quadros de candidíases (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Também pode produzir lesões que acometem tipicamente pacientes portadores de doenças malignas crônicas e/ou degenerativas, transplantados, usuários de antimicrobianos e corticóides por tempo prolongado e imunodeprimidos, como os portadores de HIV (FARIAS; LIMA, 2000; SVETAZ et al., 2007).

Com relação às infecções superficiais, especialmente as que acometem a cavidade oral, objeto de interesse deste estudo, sabe-se que a mucosa dessa região é o sítio mais frequente de candidíase superficial, e a colonização por *C. albicans* ocorre em 10 a 50% dos indivíduos sadios. De forma geral, essa colonização é controlada por antagonismo competitivo da microbiota comensal, por competições nutritivas e pela produção de substâncias tóxicas que podem também interferir no mecanismo de aderência dessas leveduras às células epiteliais. A produção de ácido láctico por essas células ou a manutenção do pH salivar também são fatores limitantes da colonização dessas leveduras (LORENZO, 2004).

De acordo com a maioria dos estudos realizados no Brasil, *Candida albicans* apresenta-se como predominante nas amostras clínicas mais cultivadas, como sangue, urina e escarro, porém, as espécies não-albicans, quais sejam *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, importantes patógenos oportunistas, aparecem com prevalências cada vez mais altas (BAUMGARTNER et al., 1996; FLOONGLADDA et al., 2002).

A levedura *Candida krusei* apresenta células ovoides e predominantemente cilíndricas. Pode formar pseudomicélio. Fermenta e assimila glicose. É isolada da cavidade oral de indivíduos saudáveis, tendo sido descrita em infecções oculares, candidoses vaginais, artrites e fungemias hospitalares (JORGE, 2007). O fenótipo de multirresistência exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de pacientes em geral, principalmente grupos comprometidos (neutropênicos, com hanseníase, com leucemia, HIV-positivo, dentre outros) e fungemias. O voriconazol é usado com sucesso em infecções por *C. krusei*, e o grupo de antifúngicos equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) tem demonstrado excelente atividade *in vitro*. Todavia, autores vêm relatando uma diminuição da sensibilidade para o voriconazol e as equinocandinas. *C. krusei* apresenta uma plasticidade com respeito a desenvolver resistência a antifúngicos, e assim como a *C. glabrata*, é considerada uma importante espécie a ser monitorada com relação à resistência antifúngica (SHEMER et al., 2001; PFALLER et al., 2008).

A *Candida parapsilosis* é um microrganismo ubíquo comumente isolado do ambiente no solo, na água e nas plantas (LUPETTI et al., 2002). Apresenta células ovoides, curtas ou alongadas, podendo ocorrer pseudomicélio longos. É considerada saprófita da pele e da cavidade oral (JORGE, 2007). Esta espécie emerge como um importante patógeno nosocomial (comensal, quando em indivíduo sadio) associada a cateteres, com manifestações clínicas que incluem fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites, e estas infecções usualmente ocorrem em associação a procedimentos invasivos ou dispositivos protéticos. Em alguns hospitais infantis, *C. parapsilosis* torna-se predominante em candidemias. Esta espécie é mais frequente em infecções na corrente sanguínea, sobretudo em neonatos, pacientes transplantados, associadas a cateteres, e pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica. A habilidade de produção de biofilmes está intimamente ligada à doença, e é morfológicamente diferente de *C. albicans*. Em estudos recentes, *C. parapsilosis* pode-se dividir em três grupos distintos (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) com base em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial, habilidade de produção de biofilmes, dentre outras. Isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos derivados azólicos 5 (COLOMBO et al., 2003; LAFFEY et al., 2005; KOCSUBÉ et al., 2007).

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Material botânico

Os frutos do *Citrus limon* L. foram coletados na Fazenda Tanques, localizada na cidade de Bananeiras, uma região localizada na microrregião do Brejo incluída na mesorregião Agreste do estado da Paraíba, no período de novembro de 2011 a fevereiro de 2012.

Esta espécie foi identificada e registrada no Herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural – UFCG, Patos-PB, onde uma exsicata foi depositada com o registro NNS 001.

4.2 Óleo essencial

Os limões foram devidamente limpos e descascados, as cascas foram picadas em cubos com facas de aço inoxidável e acondicionadas em refrigeradores até o processo de extração.

O óleo essencial e a “água de cheiro” do limão (*Citrus limon* L.) foram extraídos através do processo de hidrodestilação, utilizando o aparato de laboratório Clevenger. O material utilizado, cascas de limão (≈ 400 g) foram colocados em balão do aparato com 2 L de água destilada e em seguida aquecido através de manta aquecedora. A separação do óleo essencial e “água de cheiro” aconteceu devido à diferença de densidade de ambos na coluna graduada do Clevenger (Figura 1). O óleo coletado foi desidratado através da substância sulfato de sódio anidro e mantido sob-refrigeração.

Os procedimentos de extração, e determinação de índice de refração e densidade foram realizados no Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais - LAPAM, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural – UFCG, Campus de Patos – PB.

A determinação da composição química do óleo foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise – LMCA, do Núcleo de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba, Campus de João Pessoa – PB.

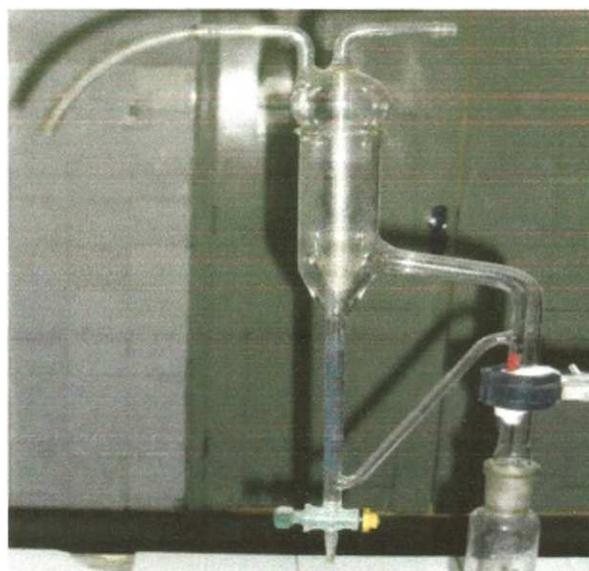


Figura 2 – Aparelho Clevenger, Patos, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor

4.3 Microrganismos

Foram utilizadas neste trabalho três estirpes do gênero *Streptococcus*: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609) cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Molecular – Campus João Pessoa – PB, Universidade Federal da Paraíba e duas cepas do gênero *Candida*: *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Campus Patos – PB, UFCG.

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário, CSTR/UFCG.

4.4 Análises microbiológicas

4.4.1 Bactérias

4.4.1.1 Meio de cultura

Para o isolamento das bactérias, o meio de cultura preparado foi o Agar Edwards (HIMEDIA) acrescido de 3% de sangue de carneiro desfibrinado em placa de Petri. Para a inoculação, o meio de cultura preparado foi o Agar Mueller-Hilton (HIMEDIA) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado em placa de Petri.

4.4.1.2 Preparo e padronização das diferentes concentrações

Os inóculos dos microrganismos teste utilizados, serão obtidos utilizando-se o seguinte procedimento: inicialmente, serão preparadas suspensões das cepas microbianas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril. Em seguida, tais suspensões serão agitadas durante 2 minutos com auxílio de aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão terá sua turbidez comparada e ajustada à turbidez apresentada pela solução de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

4.4.1.3. Difusão em placas (screening)

Nesse ensaio observa-se a atividade antibacteriana da ação do óleo essencial na concentração absoluta. Os microrganismos a serem estudados serão mantidos em Agar nutriente (HIMEDIA) a temperatura de 37 °C. Em placas de Petri estéreis foram adicionados

20 mL de Agar Muller-Hinton (HIMEDIA) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado fundido e resfriado a 45-50°C. Após solidificação do Agar, foi inoculado 100 µL da suspensão bacteriana na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. Para cada microrganismo, um volume correspondente a 20 µL do óleo e 20 µL da água de cheiro será testado em cada disco separadamente, sendo que em cada placa de Petri serão utilizados cinco discos, um controle negativo, um controle positivo com clorafenicol (30 µg), um disco com 5µL de Tween 80 estéril, um disco teste para a água de cheiro e um disco teste para óleo essencial. Após o procedimento, para multiplicação das cepas, foram incubadas a 35 ° C por 24 horas. No final do período de incubação, será considerado como atividade antimicrobiana positiva quando observado a formação de halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm (LIMA et al., 1993; SOUZA et al., 2005). As análises foram realizadas em duplicata.

Após 24 horas realizou-se a medição dos halos de crescimento das bactérias, sempre comparando com um controle da viabilidade das cepas bacterianas em Agar nutriente, sem adição do óleo essencial.

4.4.2 Fungos

4.4.2.1 Meio de cultura

Os meios de cultura usados na manutenção dos microrganismos foram: Agar e caldo Sabouraud Dextrose (DIFCO) e nos ensaios microbiológicos foram utilizados caldo RPMI 1640 (HIMEDIA) acrescido de 0,15% de Agar Agar (HIMEDIA).

4.4.2.2 Preparo e padronização das diferentes concentrações

Para a preparação das suspensões dos microrganismos (inóculo), as cepas de *Candida* selecionadas, foram mantidas em ASD, durante 24-48 horas a 35°C. O inóculo foi preparado e

padronizado em solução fisiológica a 0,9 % esterilizada. A mesma foi comparada com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da Escala Mc Farland. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Fanem) durante 2 minutos, para conter cerca de 10^8 UFC/mL.

4.4.2.3 Difusão em placas (screening)

Nesse ensaio observa-se a atividade antifúngica da ação do óleo essencial na concentração absoluta. Em placas de Petri estéreis foram adicionados 20 mL de RPMI 1640(HIMEDIA) + Agar Agar 0,15% (HIMEDIA) fundido e resfriado a 45-50°C, de acordo com a norma M27-A2 do CLSI, o meio RPMI 1640 é indicado para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade da terapia antifúngica das leveduras, adaptado nesta pesquisa adicionando Agar Agar para realização da difusão em placa. Após solidificação do Agar, foi inoculado 100 μ L da suspensão fúngica na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹. Em seguida, serão utilizados discos de papel Watmann número 3, com 7 mm de diâmetro, que serão colocados sobre o meio de cultura. Para cada microrganismo, um volume correspondente a 5 μ L, 10 μ L e 20 μ L do óleo, e 20 μ L da água de cheiro será testado em cada disco separadamente, sendo que em cada placa de Petri serão utilizados seis discos, um controle negativo, um controle positivo com Anfotericina B (5 μ L), um disco teste para a água de cheiro e dois discos testes para óleo essencial. Os ensaios foram realizados em duplicata incubados a 35°C durante 24 horas. No final do período de incubação, será considerado como atividade antifúngica positiva quando observado a formação de halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm (LIMA et al., 1993; SOUZA et al., 2005).

Após 24 horas realizou-se a medição dos halos de crescimento das leveduras, sempre comparando com um controle da viabilidade das cepas fúngicas em Agar Sabouraud, sem adição do óleo essencial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos componentes do óleo essencial

O óleo apresentou ausência de coloração, densidade relativa de 0,8388 e índice de refração de 1,467. A análise através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massa identificou de 21 componentes. Entre os fitoconstituintes, o limoneno se apresentou como o componente majoritário do óleo essencial de *C. limon* com 63,22% do total de constituintes presentes, seguido 1,4-ciclohexadieno,1-metil-4-(1-metiletil) - (13,20%) e 1,6-Octadieno-3-ol,3,7-dimetil- (7,97%). Os fitoconstituintes e seus respectivos percentuais na composição do óleo essencial estão expostos na tabela 1.

Tampieri et al. (2005), em uma análise da composição do óleo essencial de *C. limon* encontrou resultado semelhante, descrevendo cerca de 40 fitoconstituintes, sendo os mais comuns o limoneno (62,9%), o β -pineno (11,2%) e o γ -terpinene (8,94%).

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/ microrganismos, planta/ insetos e planta/ planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

Entre os compostos individuais com alta atividade repelente presentes nas misturas, encontra-se o Limoneno. O Limoneno, terpenóide monocíclico, é usado como inseticida para o controle de ectoparasitas de animais, mas apresenta atividade contra insetos, ácaros e microrganismo (HOLLINGSWORTH, 2005). Por ser um produto natural é o principal constituinte das frações terpenóides dos óleos de limão e de laranja e com baixa toxicidade ao

homem, tem apelo comercial importante e tem sido apontado como uma alternativa aos inseticidas sintéticos (ROSA, 2010).

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

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de *C. limon* Linneo. Patos, Paraíba, 2012.

Composto	Tempo de Retenção	Área	% na formulação
Alpha-Thujene	5,758	50266	0,62
Alpha-Pineno	5,967	141649	1,87
Sabineno	7,085	23993	0,30
Beta-Pineno	7,213	99904	1,12
Mirceno	7,564	288142	3,48
Alpha-Terpinene	8,478	39585	0,35
Para-Cimeno	8,761	121844	1,04
Limoneno	8,984	10142187	63,22
1,4-ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletil) -	10,030	1317510	13,20
(+)-4-Careno	11,191	71844	0,73
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-	11,607	830598	7,97
3-ciclo-hexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil) -, (R) -	14,978	54914	0,47
3-ciclo-hexeno-1-metanol, alfa., alpha.4-trimetil-	15,554	117912	1,09
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-, (Z) -	17,189	105611	0,96
Neral	17,791	33596	0,27
Acetato de linalil	18,389	128396	1,01
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-, acetato, (Z) -	23,231	31541	0,30
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil-, acetato, (E) -	24,065	21448	0,22
Benzeno, 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil) -	25,031	32804	0,28
Alpha-, Cis-Bergamoteno	26,343	68481	0,55
Beta-Bisaboleno	29,413	128975	0,96

5.2 Análise da Difusão em Placas (screening)

5.2.1 Bactérias

Observou-se que a “água de cheiro” e óleo essencial do limão não apresentaram atividade antibacteriana (Figura 3, 4 e 5). No meio de controle, isento de óleo essencial do produto teste, verificou-se crescimento das cepas, caracterizando sua viabilidade em Agar Nutriente.

A cárie dentária é uma doença multifatorial, em que se verifica a interação de quatro fatores principais: hospedeiro, dieta, tempo e a microbiota (LORSCHIEDER et al., 2004). A formação do biofilme dental ocorre através da fixação de bactérias sobre as superfícies dentárias. Assim, o biofilme, devido à sua característica de contínua agressão, vai adquirindo novas espécies em cada etapa do seu desenvolvimento. Dentre estes microrganismos podemos citar: *Streptococcus mitis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. mutans* e *Lactobacillus casei* (HIROSE, 1993; DUARTE et al., 1995; JORGE, 1995; COCHRAN, 1996).

O biofilme dentário é um depósito bacteriano aderido à superfície do dente composta por inúmeras espécies que interagem combinando-se em arranjos complexos (SILVA et al., 2006). No biofilme, não é apenas a presença de um único organismo que determina as suas propriedades, mas uma interação entre todos os colonizadores que é importante. Assim, a cárie dentária, é reconhecida como uma doença que resulta não apenas da presença de *S. mutans* ou qualquer organismo único no biofilme dental (KURAMITSU et al., 2007).

No estudo realizado por Araújo et al. (2009) observou-se a efetividade do extrato da casca de *Citrus limon* Linneo. (limão) que não apresentou atividade bacteriana, porém apresentou atividade inibindo a aderência ao vidro das linhagens ensaiadas *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei* numa concentração 1:2.

Com o resultado demonstrado por Araújo et al. (2009) em relação ao extrato da casca do limão, testamos o óleo essencial por este apresentar diferentes compostos, mas o presente estudo também identificou a ausência de atividade antibacteriana. Porém estudos posteriores poderão identificar os compostos de antiaderência, que poderão ser associados a outros

fármacos ou produtos naturais, já que para ocorrer o processo da formação da cárie a necessidade da aderência de microrganismos formadores de biofilme.

Em relação a outros óleos essenciais, os óleos de guaçatonga, lipia, citronela, canela, cravo, poejo e hortelã apresentaram atividade para o microrganismo *S. mutans*, sendo que os óleos essenciais de citronela e cravo apresentaram halos de inibição maiores que o controle nas concentrações de 5,0 e 2,5 µg/L (NOGUEIRA, 2007).

Segundo SILVA et al.,(2008) a eficácia do extrato de alecrim sobre as linhagens ensaiadas, *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, foram sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis*, exceto *Streptococcus mitis* ATCC 9811. Foram observados halos de inibição de crescimento bacteriano que variaram de 11 mm a 18mm de diâmetro, sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição superior a 12 mm. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim.

Apesar da ineficácia sobre microrganismos do biofilme dentário o óleo essencial do limão apresenta sobre outros microrganismos ser um eficiente antibacteriano. Estudos demonstrados por Prabuseenivasan, Jayakumar e Ignacimuthu (2006) observaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. limon* sobre bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Kebsiella pneumoniae*.

Os antimicrobianos naturais podem contribuir no controle do crescimento da microbiota oral contornando transtornos propiciados por cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais. Entre as vantagens dos fitoterápicos que justificam seu uso podemos citar: efeito sinérgico, devido aos vários fitoconstituintes que atuam melhor em associação; associação de mecanismos por compostos atuando em moléculas alvos diferentes, proporcionando ações diversificadas em todo o organismo; baixos riscos de efeitos colaterais, devido às baixas concentrações em que os princípios ativos se apresentam nas plantas, sem considerar correlações dose-tempo; menores custos de pesquisa, quando se compara ao desenvolvimento de um novo fármaco (YUNES et al., 2001).

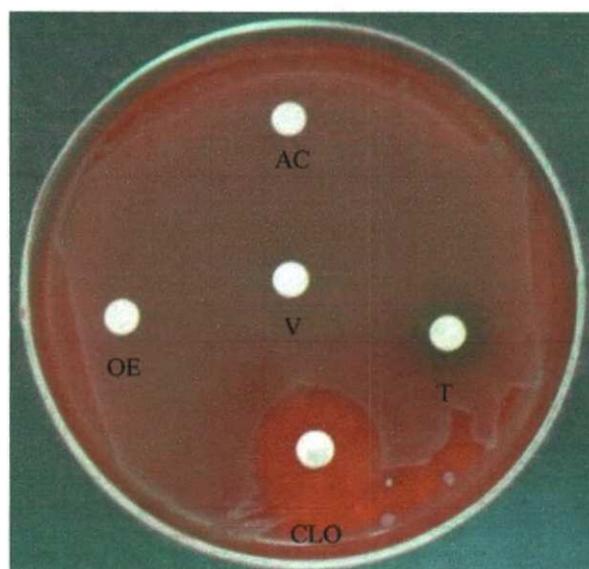


Figura 3 – Amostra da cepa *S. mutans*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, CLO – Disco de clorafenicol (halo de 20 mm), T – Disco com 5 μ L de Tween 80, AC – Disco com 20 μ L de “água de cheiro” e OE – Disco com 20 μ L de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor

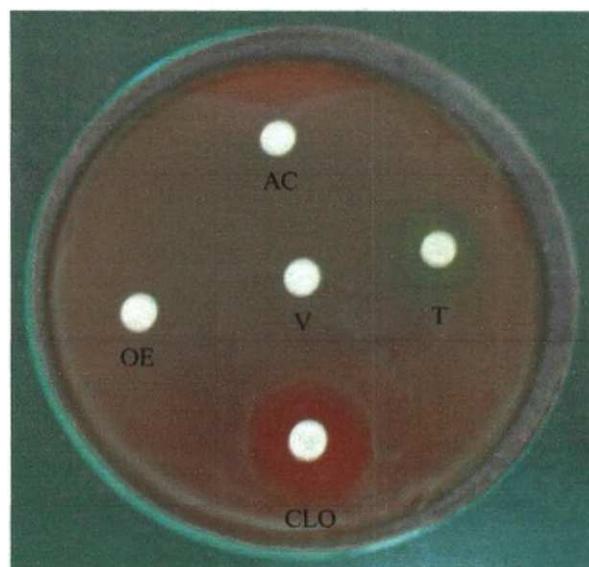


Figura 4 – Amostra da cepa *S. sobrinus*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, CLO – Disco de clorafenicol (halo de 18 mm), T – Disco com 5 μ L de Tween 80, AC – Disco com 20 μ L de “água de cheiro” e OE – Disco com 20 μ L de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor

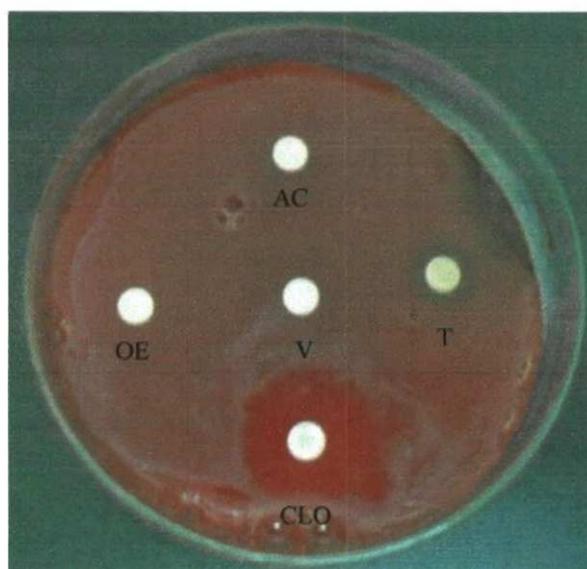


Figura 5 – Amostra da cepa *S. sanguis*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, CLO – Disco de clorafenicol (halo de 20 mm), T – Disco com 5 μL de Tween 80, AC – Disco com 20 μL de “água de cheiro” e OE – Disco com 20 μL de óleo essencial, Patos, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor.

5.2.2 Fungos

Observou-se que a “água de cheiro” não apresentou atividade antifúngica, mas óleo essencial do limão frente a ambas as cepas e na quantidade de 20 μL apresentou atividade antifúngica, com halo superior a 10 mm (Figura 6 e 7). No meio de controle, isento de óleo essencial do produto teste, verificou-se crescimento das cepas, caracterizando sua viabilidade em Agar Sabouraud.

A análise da susceptibilidade antifúngica tem sido utilizada em vários estudos que visam obter novos produtos com atividade antifúngica, no controle da terapêutica antifúngica, na caracterização de amostras fúngicas e também se tornou muito importante para aplicabilidade clínica visto que pode ajudar na escolha correta do fármaco a ser utilizado no tratamento anti-infeccioso (HOFFMAN; PFALLER, 2001; SILVA et al., 1998).

O óleo essencial de *R. officinalis* mostrou-se ativo somente sobre 04 cepas ensaiadas, sendo observado halos de inibição com diâmetro de no máximo 12mm (*C. krusei* FCF-281, *C. parapsilosis* MD-6). O óleo essencial de *E. citriodora* a 8% mostrou-se ativo na inibição de

quatro cepas ensaiadas com formação de halos de inibição com diâmetro de até 24 mm (*C. guilliermondii* LM-6T). O óleo essencial de *C. limon* a 4% inibiu 05 das cepas ensaiadas (*C. guilliermondii* LM-6T, *C. krusei* FCF-281, *C. parapsilosis* ME-2, *C. parapsilosis* MD-6, *C. stellatoidea* LM-41V), sendo desenvolvidos halos de inibição de crescimento com diâmetro igual ou próximo a 10mm (LIMA, 2006). Resultados similares foram registrados por Belém (2002) em avaliação da efetividade de tal produto na inibição do crescimento de *M. furfur*.

Souza *et al.* (2005) encontraram que o óleo essencial de *C. limon* apresentou atividade inibitória sobre alguns tipos de fungos filamentosos, como *A. flavus*, *Rizophus* spp. e *A. niger*, com halos de inibição de 13, 12 e 10mm, respectivamente.

Considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados, pode-se inferir que a pesquisa de busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal mostra-se de relevante significância. É possível observar o potencial antibiótico que os produtos vegetais possuem, e por consequência, a real possibilidade de aplicação destes produtos na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica. Porém, é necessário citar a necessidade de realização de estudos de cunho toxicológico e clínico como suporte de segurança para o uso destes produtos como fármacos (LIMA, 2006).

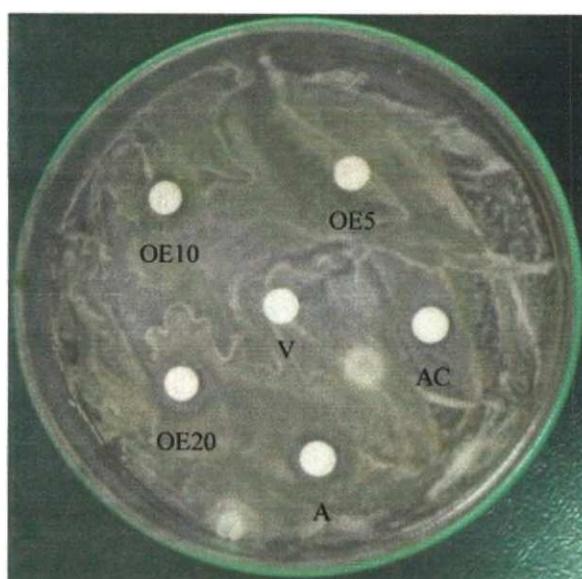


Figura 6 – Amostra da cepa *C. Krusei*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, A – Disco com 5 μ L de Anfotericina B (halo de 11 mm), AC – Disco com 20 μ L de “água de cheiro”, OE5 – Disco com 5 μ L de óleo essencial, OE10 – Disco com 10 μ L de óleo essencial e OE20 – Disco com 20 μ L de óleo essencial (halo de 11 mm), Patos, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor

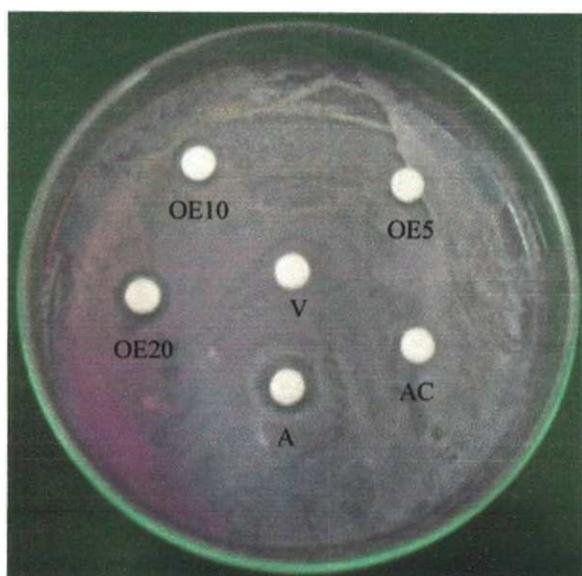


Figura 7 – Amostra da cepa *C. parapsilosis*, semeada por espalhamento e colocados os discos para averiguação da atividade antibacteriana. V – Disco virgem, A – Disco com 5 μ L de Anfotericina B (halo de 12 mm), AC – Disco com 20 μ L de “água de cheiro”, OE5 – Disco com 5 μ L de óleo essencial, OE10 – Disco com 10 μ L de óleo essencial (halo de 9 mm) e OE20 – Disco com 20 μ L de óleo essencial (halo de 11 mm), Patos, Paraíba, 2012. Fonte: Próprio autor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados expostos, pode-se concluir que o óleo essencial do *C. Limon*:

- Apresentou uma boa variedade de compostos, sendo o limoneno o composto em maior quantidade;
- O óleo essencial não apresentou atividade antibacteriana frente às cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus sobrinus*, muito embora, estudos que relacionem a coagregação desses microrganismos para formação do biofilme não foi abordada nesse estudo, assim sua atuação frente a esses microrganismos não pode ser descartada, pois a sua atuação na formação de biofilme se torna mais importante que sua ação bactericida;
- O óleo essencial apresentou atividade antifúngica em potencial frente às cepas de *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Desta forma, sugere-se que esse óleo pode ser um meio alternativo e economicamente viável para o controle de candidoses. Tornam-se necessários estudos que intensifiquem o conhecimento sobre o óleo essencial do *Citrus limon* para entendermos o mecanismo de ação sobre esses fungos, bem como, realizar pesquisas de biocompatibilidade e assim, disponibilizar este óleo para o uso terapêutico em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, J. A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, 2005;43(11):5721-32.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.
- ARAÚJO, C. R. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S. Atividade antifúngica in vitro da casca do *Anacardium occidentale* Linn. sobre levedura do gênero *Candida*. **Arq. em Odont.**, Belo Horizonte, v. 41, n. 3, p. 193-272, 2005.
- ARAÚJO, C. R. F. et al. "Estudo da ação antimicrobiana e antifúngica do extrato do *Citrus limon* Linn. (limão) e do *Anacardium occidentale* Linn. (cajueiro) sobre microorganismos do biofilme dental e leveduras do gênero *Candida*". Plantas medicinais na odontologia: potencial antimicrobiano. João Pessoa: Editora Universitária da UFPB, p.123-125, 2009.
- BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. **J. Clin. Microbiol.** 34:454-456, 1996.
- BELÉM, L. F. **Estudo epidemiológico da pitiríase versicolor no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico.** João Pessoa, 178p. Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 2002.
- BELLETTI, N. et al. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **J. of Agric. and Food Chem.**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.
- BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 40: 349-356, 2007.
- BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant. Physiol.**, v. 124, p. 507-514, 2000.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. **Act. Odontol. Scand.**, v.48, p. 61-69, 1990.

BUISCHI, Y. P. **Promoção de Saúde Bucal na Clínica Odontológica**. São Paulo: Artes Médicas EAP - APCD, 2000.

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

BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils: potential application in food**. Netherlands, Utrecht: Utrecht University, 2007. ISBN/EAN: 978-90-393-4661-7.

CANETTIERI A. C. V. et al. Efeito do anticorpo monoclonal 56G sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* em caldo e no acúmulo de placa bacteriana in vitro. **Cienc. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 9, n.4, p. 67-75. Out/dez. 2006.

COCHRAN, D. L. **Remoção de placa e cálculo: considerações para o profissional**. São Paulo: Quintessence, 1996.

COLOMBO, A. L.; GIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36(5): 599-607, 2003.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade da Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do CLSI (ISBN 1-56238-469-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos, 2002.

DAHLÉN, G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. **Adv. Dent. Res.**, v. 7, p.163-74, 1993.

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

DE LORENZO, J. L. **Microbiologia, ecologia e imunologia aplicadas à clínica odontológica**. São Paulo: Atheneu Editora, 2010.

DHARMENDRA, S. et al. Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. **Current-Scien.**; 80(10):1264-1266, 2001.

DORMAN, H. J. D; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J of Appl. Microb.**, Oxford, v. 88, p.308-316, 2000.

DUARTE, C. A.; MARCONDES, P. C.; RAYEL, A.T. Transmissibilidade de microbiota bucal em humanos: repercussão sobre o dente e o periodonto: revisão da literatura. **Rev. Period.**, v. 4, p. 211-214, 1995.

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

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 42, n. 3, 2006.

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

FLOONGLADDA, S. et al. Comparative evaluation of Candi Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isoletes. **Myc.**, 45:75-78, 2002.

FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, v.61, n.2, p.201-208, 2008.

GARCIA, G. O. et al. Uses and properties of Citrus flavonoids. **J. of Agric. and Food Chem.**, v. 45, p. 4505- 4515, 1997.

HÄGG, U. et al. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. **Eur. J. Orthod.**, 26(6):623-9, 2004.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY T.V. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **J. Antimicrob. Chem.**, v. 42, p. 591-595, 1998.

HIROSE, H. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth surface caries increment. **Car. Res.**, v. 27, p. 292-297, 1993.

HOFFMAN, H. L; PFALER, M. A. In vitro antifungal susceptibility testing. **Pharmacot.**, v. 21, n. 2, p. 111-123, 2001.

HOLLINGSWORTH, R.G., Limonene, a Citrus Extract, for control of Mealybugs and Scale insects. **J. of Econ. Entomol.**, v.98, n°3, p. 772-779, 2005.

JOHANN, S. "Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos". 2003. 83f. Dissertação (Mestrado). UFSC, Florianópolis, 2003.

JOHANN, S. et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 681-685, 2007.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia bucal**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1995. 121 p.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**, 3.ed., São Paulo: Livraria Editora Santos, 2007.

KATHRYN, L.; RUOFF, R.A.; WHILEY, AND D. BEIGHTON. Streptococcus. In: **Manual of Clinical Microbiology**. MURRAY, P.R. 7 ed, p. 283-296, 1999.

KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Sporotrichosis In: **Medical Mycology**. Lea & Fibeger, Philadelphia, p. 707-729, 1992.

KOCSUBÉ, S. et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. **J. Med. Microbiol.**, 56: 190-195, 2007.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **An. Rev. of Microbiol.** Palo Alto, v. 54, p. 413-37, 2000.

KURAMITSU, H. K. et al. Interspecies interactions within oral microbial communities. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Los Angeles, v.71, n.4, p. 653-70, dec. 2007.

LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação de fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ, C. S.; PETTINATI, A. S; SALEBIAN, A. **Candidíases**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1980, 190p.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAFFEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype swiching affects biofilm formatio by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, 151: 1073-1081, 2005.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R.; Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 135-148, 2006.

LIMA, E. D. et al. In vitro antifungal activity of essential oil obtained from officinal plants against dermatophytoses. **Myc.**, v. 36, p. 333-336, 1993.

LIMA, E. O. et al. Preliminary evaluation of antifungal activity of Xanthoxyline. **Acta Farm. Bon.**, v.14, n.3, p. 213-216, 1995.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

LORSCHIEDER, J. A. et. al. Avaliação da atividade bactericida in vitro de óleos essenciais sobre bactérias cariogênicas. In: **Anais do 2º COSIMP**. UNIOESTE. p.120. 2004.

LOTA, M-L. et al. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p. 796-805, 2002.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18: 447-454, 2008.

LUPETTI, A. et al. Horizontal transmission of Candida parapsilosis candidemia in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, 40(7): 2363-2369, 2002.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (Citrus limon) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, p. 58-63, 2009.

MALTZ, M. T. **Cárie: fatores relacionados**. In: PINTO, V. G. Saúde Bucal Coletiva, 4 ed. São Paulo: Santos, p. 319-339, 2000.

MARSH, P.; MARTIN, M.V. **Microbiologia Oral**. 4ed. São Paulo: Editora Santos. 2005.

MIDLEY, G.; CLAYTON, Y. M.; HAY, R. J. **Diagnóstico em cores: micologia médica**. São Paulo: Manole, 1998.

NAVARRO, R. S.; ESTEVES, G. V.; YOUSSEF, M. N. Estudo clínico do comportamento de escolares mediante escovação supervisionada e motivação no controle de placa bacteriana. **Rev. Odontol. Univ.**, São Paulo. 10:153-7, 1996.

NOGUEIRA, M. A. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.93-97, 2007

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 3, 2007.

PEREIRA, J.V. et al. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): Efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifício sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev. Odonto. Cienc.** 20: 262-269, 2005.

PEREIRA, M. S.V. et al. **Plantas medicinais na odontologia: potencial antimicrobiano**. João Pessoa: Editora Universitária da UFPB, 2009.

PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. **J. Clin. Microbiol.**, 46(2): 515-521, 2008.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complem. Altern. Med.**, v. 6, p. 1-8, 2006.

PRIETO-PRIETO, J; CALVO, A. Microbiological basis of oral infections and sensitivity to antibiotics. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, 2004;9:11-4.

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

RIPPON, J. W. **Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988.

RODRIGUES, V. E. G. **Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande, MG**. 2007. Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

ROSA, J. D. **Atividade repelente e sistemas nanoestruturados desenvolvidos com Limoneno**: Revisão. 2010. Trabalho apresentado como requisito parcial para aprovação na Disciplina TCC1 e TCC2, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SÁ, L. D. et al. Activité antimicrobienne d'huiles essentielles sur les bacteries qui causent la conjunctivite. **Bol. da Socied. Brot.**, v. 67, p. 99-103, 1996.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 19: 321-324, 2009.

SANTOS, F. A. **Atividade antibacteriana, antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* PERS e *Psidium pohliatum* BERG**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará, 1997.

SANTOS, S. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 17: 215-219, 2007.

SHEMER, R. et al. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. **Microbiol.**, 147: 2021-2028, 2001.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SILVA, M. A. S. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 18: 236-240, 2008.

SILVA, M. R. R.; PAULA, C. R.; SILVA, S. C.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R. Drug resistance of yeasts isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. **Rev. de Microb.** v. 29, n. 4, p. 272-275, 1998.

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

SOET, J. J. et al. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Car. Res.**, 25:116-122, 1991.

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on growth of various moulds isolated from foods. **Braz. Arch. of biol. and technol.**, v. 48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, G. F. M. et al. Abordagem imunológica da cárie dental. **PGRPos Grad. Rev. Fac. Odontol.** São José dos Campos, v. 4, n. 2, maio/ago. 2001.

SVETAZ, L.; AGUERO, M. B.; ALVAREZ, S.; LUNA, L. FERESIN, G. et al. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. **Plant. Med.**, v. 73, n. 10, p. 1-7, 2007.

TAMPIERI, M. P. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathol.**, v. 159, p. 339-345, 2005.

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

VASCONCELOS, K. R. F. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18(Supl.): 733-738, 2008.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R.; CECHINEL, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nov.**, 4:147-52, 2001.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis candidásica. **Rev. Iberoam. de micol.**, v. 19, p. 22-24, 2002.