

VIVIANE STORTO DE TOLEDO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel SOBRE *Candida albicans*, NO INTERIOR DO CANAL RADICULAR *in vitro* E COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

SÃO PAULO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Toledo, Viviane Storto de

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial *Melaleuco alternifolia cheel* sobre *Candida albicans*, no interior do canal radicular in vitro e como medicação intracanal / Viviane Storto de Toledo – São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Maria de Fátima Costa Pires

1. Óleo de *Melaleuca*/uso terapêutico 2. *Candida albicans*
3. Produtos com ação antimicrobiana 4. Endodontia 4. Cavidade pulpar/efeito de drogas

SES/CCD/CD-282/13

Dedicatória

**Dedico este mestrado aos meus pais Jayme Storto e Margarete Reis Storto pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, dedico ao meu marido Leonardo Toledo de Aguiar por toda compreensão e incentivo durante esta jornada .
Dedico também a minha filha Lais, a coisa mais preciosa desta vida .**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado.

A Dra. Maria de Fatima Costa Pires pela orientação e por ter acreditado em mim e no potencial deste projeto de pesquisa.

Ao Colega de profissão Daniel Silva Abrahão pela participação e incentivo em todas as etapas da realização deste trabalho

Ao Laboratorio de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz pela participação indispensável neste estudo, principalmente à Profa. Dra. Noemi Nosomi Taniwaki e a Jonas José Kisielius pela disposição e incentivo.

Agradeço também ao Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso pela colaboração e pelos diversos debates sobre a melhor maneira de condizer o trabalho.

A Patricia de Souza Santos, pela colaboração na compilação dos resultados obtidos no laboratório.

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	16
LISTA DE FIGURAS	18
LISTA DE QUADROS	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Candida albicans</i>	20
1.2 <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	23
1.2.1 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	24
1.3 Polpa dental.....	26
1.4 Necrose Pulpar.....	26
1.5 Tratamento endodôntico.....	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. METODOLOGIA	32
3.1 <i>Candida albicans</i>	32
3.2 Isolados de <i>C. albicans</i>	32
3.3 Pesquisa de fatores de virulência.....	33
3.4 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	35
3.4.1 Análise Cromatográfica.....	35
3.5 Tensoativos e solventes.....	36
3.5.1 Pesquisa da interferência dos polissorbatos Tween 20, Tween 80 e solvente dimetilsulfoxido DMSO sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e ICB 12 A.....	37
3.6 Pesquisa <i>in vitro</i> da atividade do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel sobre <i>C. albicans</i> sem adição de tensoativos e solvente.....	36
3.7 Pesquisa <i>in vitro</i> da atividade do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel sob acrescido de tensoativos e solvente re <i>C. albicans</i>	40

3.8 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel sobre <i>C. albicans</i> no interior do canal radicular.....	41
3.9 Pacientes.....	45
3.10 Controle de qualidade e biossegurança.....	48
3.18 Descarte de resíduos.....	48
3.12. Considerações Éticas.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1 <i>Candida albicans</i>	49
4.1.1 Fatores de virulência.....	49
4.1.1.1 Atividade enzimática - Produção de exoenzimas:Proteinase e Fosfolipase.....	49
4.1.1.2 Morfotipos.....	52
4.2 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	52
4.2.1 Análise cromatografica	52
4.3 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel sobre cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12 A) na ausência de tensoativos e solvente.....	55
4.4 Atividade <i>in vitro</i> dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20), Tween 80 (polissorbato 80) e ao solvente DMSO sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12 A).....	56
4.5 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel acrescido de tensoativos Tween 20 (polissorbato 20), Tween 80 (polissorbato 80) e ao solvente DMSO sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12A).....	57
4.6 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel na ausência dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12A) e isolados biológicos.....	61
4.7 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.....	70
4.8 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.....	76

4.9 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel na presença do solvente DMSO sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12A) e isolados biológicos.....	82
4.10 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel, sobre <i>C. albicans</i> no interior do canal radicular.....	88
4.11 Atividade <i>in vivo</i> do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel, no interior do canal radicular.....	92
Grupo 1 - Pacientes tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP) – Grupo Controle.....	93
Grupo 2 - Pacientes tratados com óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> 20% v/v com Tween 20 a 0,02%.....	98
4.12 Características morfológicas das leveduras isoladas dos canais radiculares dos grupos 1 e 2.....	103
4.13 Características morfológicas e de sensibilidade das leveduras isoladas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos 1 e 2 frente ao óleo essencial de <i>M.alternifolia</i> Cheel com Tween 20 a 0,02%.....	104
5. DISCUSSÃO.....	109
5.1 <i>Candida albicans</i>	110
5.2 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	114
5.3 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel na ausência e na presença dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB – 12 A) e isolados biológicos.....	120
5.4 Atividade “ <i>in vitro</i> ” do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel, sobre <i>C. albicans</i> no interior do canal radicular.....	121
5.5 Atividade <i>in vivo</i> do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel, no interior do canal radicular.	121
6. CONCLUSÕES.....	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
8. ANEXOS.....	139

RESUMO

Candida albicans pode estar presente nas patologias pulpares tanto na fase de tratamento quanto após a obturação dos canais radiculares, sendo responsáveis, por recidivas que levam a necessidade de retratamento do canal, pois as substâncias químicas auxiliares não agem sobre algumas amostras dessas leveduras. Novas pesquisas com produtos de origem vegetal como os óleos essenciais visam o tratamento efetivo destas infecções. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel é popularmente conhecido por suas atividades antimicrobianas. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans*, no interior do canal radicular *in vitro* e como medicação intracanal e em doses subinibitórias a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e as características fenotípicas (franjas). Foram utilizados 64 isolados de *C. albicans* e duas cepas padrão sendo uma *C. albicans* ATCC 90028 e uma *C. albicans* ICB 12 A. Para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, na base dois, em meio RPMI 1640, com o óleo puro, com Tween 20 e Tween 80 a 0,02% como tensoativos e DMSO a 1% como solvente. *In vitro*, em dentes contaminados com *C. albicans*, o óleo essencial de *M. alternifolia* em meio RPMI 1640, com Tween 20 a 0,02% foi utilizado como medicamento. *In vivo* como medicação intracanal o óleo essencial de *M. alternifolia*, 20% v/v (16.000µg/mL), com Tween 20 a 0,02% foi utilizado em 10 pacientes com polpa necrosada. E como controle em outros 10 pacientes com polpa necrosada, Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP). Não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia*. Para os 64 isolados e as duas cepas padrão, os valores da Concentração Fungicida Mínima (CFM) CFM 50 e CFM 90 para o óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência de tensoativos e solventes foi 1250 µg/mL (1,56%) e 2500 µg/mL (3,12%), respectivamente. Na presença de Tween 20 a 0,02% foi 312,5 µg/mL (0,39%) e 1250 µg/mL (1,56%). Com Tween 80 a 0,02%, 625 µg/mL (0,78%) e 1250 µg/mL (1,56%). E com DMSO a 1% 2500 µg/mL (3,12%) e 5000 µg/mL (6,25%). Nas doses subinibitórias ocorreu diminuição na produção de proteinase e fosfolipase e franjas. Na avaliação *in vitro* no interior do conduto radicular observou-se crescimento em apenas um dente na concentração do óleo essencial a 10%. No estudo *in vivo* foram isoladas leveduras em seis condutos radiculares de pacientes na primeira coleta sendo um isolado de *C. albicans* do grupo tratado com PRP e cinco isolados (4 *C. albicans* e 1 *Candida sp*) do grupo tratado com óleo essencial. Nas condições desse estudo o tratamento do canal radicular *in vivo* com o óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração a 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 á 0,02% foi eficiente. A levedura com maior CFM foi a *Candida sp* (5.000µg/mL – 6,25%).

Palavras chaves: *Candida albicans*, *Melaleuca alternifolia*; *Tea tree*, Tratamento endodontico, Medicação intracanal, Endodontia, canal radicular

ABSTRACT

Candida albicans can be present in pulpal pathologies, in the pulp treatment and after the filling of the root canals, is responsible for recurrence of the infection leading to the need for root channel retreatment, since the auxiliary chemicals do not act on some samples of these yeasts. New research with products of the vegetable origin like essential oils aimed at the effective treatment of these infections. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel is popularly known for its antimicrobial activity. The aim of this work was to study the activity of the essential oil of *M. alternifolia* Cheel on *C. albicans*, *in vitro*, inside the root canal system *in vitro* and as a dressing in subinibitory doses and evaluate exoenzyme production proteinase and phospholipase and phenotypic characteristics (fringes). A total of 64 strains of *C. albicans* and two standard samples being a *C. albicans* ATCC 90028 one *C. albicans* ICB 12 A were used in this study. To evaluate *in vitro* antifungal activity of essential oil of *M. alternifolia* used the technique of microdilution in base two in RPMI 1640 with pure oil plus Tween 20 and Tween 80 at 0.02% as surfactant and 1% DMSO as a solvent. *In vitro* inside teeth contaminated with *C. albicans*, essential oil of *M. alternifolia* in RPMI 1640 and 0.02% Tween 20 as medicament. *In vivo* as dressing in 10 patients with necrotic pulp essential oil of *M. alternifolia*, 20% v / v (16.000µg/mL) with 0.02% Tween 20. And paramonochlorophenol associated with polyethylene glycol 400 in Rinossoro® (PRP) in the other 10 patients with necrotic pulp. There were no resistant isolates of essential oil *M. alternifolia*. For the 64 isolates and the two standard samples, the values of Minimum Fungicidal Concentration (MFC) MFC 50 MFC 90 for the essential oil of *M. alternifolia* in the absence of surfactants and solvents was 1250 µg/mL (1.56%) and 2500 µg/mL (3.12%), respectively. In the presence of Tween 20 0.02% was 312.5 µg/mL (0.39%) and 1250 µg/mL (1.56%). With Tween 80 0.02%, 625 µg/mL (0.78%) and 1250 µg/mL (1.56%). And with DMSO 1% 2500 µg/mL (3.12%) and 5000 µg/mL (6.25%). In subinibitory doses the production of proteinase and phospholipase and fringes decreased. *In vitro* evaluation inside the root canal system growth was observed in only one tooth at a concentration of essential oil 10%. In the *in vivo* study were isolated yeasts in six root canals of patients in the first collection being an isolate of *C. albicans* group treated with PRP and five isolates (4 *C. albicans* and 1 *Candida sp*) of the group treated with essential oil. The conditions of this study root canal treatment *in vivo* with essential oil of *M. alternifolia* in the concentration to 20% v / v (16.000µg/mL) plus Tween 20 0.02% was efficient. The yeast with higher MFC was *Candida sp* (5.000µg/mL - 6.25%).

Keys Words: *Candida albicans*, *Melaleuca alternifolia*; Tea tree, intracanal medication, Endodontic treatment, endodontics, root channel

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-)	Negativo
(+)	Positivo
°C	Graus Celsius
μ	Média
dp	Desvio padrão
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	
Concetração Inibitória Mínima	
CIM 50	CIM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.
CIM 90	CIM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil sulfoxido
et al.	e outros
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
g	Gramma
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV+	Paciente com sorologia positiva para HIV
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ISO	<i>International Standartization Organisation</i>
Mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
NDP	Fosfato de Dexametasona, Paramonoclorofenol e Polietilenoglicol 400 em Rinossoro®
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogênico
PRP	Paramono + Rinossoro + Propilenoglicol 400
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
Pz	Atividade enzimática
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SAP	<i>Secreted Aspartyl Proteinase</i>
SUS	Sistema Unificado de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de isolados biológicos de origem humana e cepas padrão de <i>Candida albicans</i>	49
Tabela 2 Atividade enzimática (Pz): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de cepas padrão de <i>Candida albicans</i>	49
Tabela 3 Atividade enzimática (PZ): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de isolados de <i>Candida albicans</i>	50
Tabela 4 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima de produção de proteinase e fosfolipase de isolados de <i>Candida albicans</i>	52
Tabela 5 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel sobre as cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e sobre a atividade enzimática e morfotipos dessas leveduras na ausência de tensoativos e solvente.....	55
Tabela 6. Atividade dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre o crescimento de cepas padrão de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB - 12 A).....	56
Tabela 7 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M alternifolia</i> Cheel acrescido do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre o crescimento de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB – 12 A).....	58
Tabela 8 Atividade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>M alternifolia</i> Cheel acrescido do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre a produção de proteinase e fosfolipase de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028 e ICB – 12A)- concentração subinibitória.....	58

Tabela 9 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre o crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A).....59

Tabela 10 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre a produção de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A)- concentração subinibitória.....59

Tabela 11 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do solvente DMSO nas concentrações 0,5; 1 e 2% sobre o crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A).....60

Tabela 12 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do solvente DMSO nas concentrações 0,5; 1 e 2% sobre a produção de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A)- concentração subinibitória.....60

Tabela 13 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre os isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).....62

Tabela 14 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre os isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).....64

Tabela 15 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre os isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).....64

Tabela 16 Valores CIM 50, CIM 90, CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre os isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).....65

Tabela 17 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na ausência de tensoativos e solvente.....67

Tabela 18 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel – controle.....69

Tabela 19 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na ausência de tensoativos e solvente.....69

Tabela 20 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia*

Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativos Tween 20 (polissorbato 20).....73

Tabela 21 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel – controle.....75

Tabela 22 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20).....75

Tabela 23 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80).....79

Tabela 24 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel – controle.....81

Tabela 25 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80).....81

Tabela 26 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido).....85

Tabela 27 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel – controle.....87

Tabela 28 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido).....87

Tabela 29 Atividade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel na Concentração Fúngica Mínima (CFM) e a 10% (8.000µg/mL) sobre amostra padrão e isolados de *Candida albicans* com diferentes atividades enzimáticas no interior do conduto dentinário *in vitro*.....92

Tabela 30 Pacientes, sexo, patologia e características morfológicas das leveduras isoladas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos 1 e 2...104

Tabela 31 Características morfológicas e de sensibilidade das leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2 frente ao óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02%.....105

Tabela 32 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da Concentração Fúngica Mínima (CFM) ao óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de

Tween 20 a 0,02% frente às leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2.....107

Tabela 33 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase das leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2 na ausência - Controle e na presença do óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02%.....108

Tabela 34 Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido de Tween 20 na concentração a 0,02% sobre leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2.....108

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência de tensoativos e solvente sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....66

Gráfico 2 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência de tensoativos e solvente sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....66

Gráfico 3 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....72

Gráfico 4 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....72

Gráfico 5 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 80 (polissorbato 80) sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....78

Gráfico 6 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 80 (polissorbato 80) sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....78

Gráfico 7 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do solvente DMSO sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....84

Gráfico 8 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do solvente DMSO sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.....84

Gráfico 9 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02% frente as leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2.....107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* na dentina: **A** - magnificação 1900 X e **B** - magnificação 5000X.....22
- Figura 2 A e B** - *Melaleuca alternifolia* Cheel - **A**: hábito arbóreo; **B**: folhas e floração.....24
- Figura 3** - Suporte com 2 grupos de 5 dentes45
- Figura 4** - Cromatograma do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.....54
- Figura 5** - Cromatograma expandido (4-16 min) do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.....55
- Figura 6** - Cromatograma expandido (22-33 min) do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.....55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Compostos voláteis identificados no óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	53
Quadro 2 – Relação dos tipos de dentes e Comprimento real do dente (CRD) utilizados no ensaio “in vitro” do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel, sobre <i>C. albicans</i> no interior do canal radicular.....	89
Quadro 3 Pacientes do grupo controle, tipos de dentes, presença de sinais e sintomas antes e após o tratamento endodôntico com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP) identificado por meio de exames subjetivos, objetivos e radiológicos e levedura isolada.....	94
Quadro 4 Pacientes do grupo experimental, tipos de dentes, presença de sinais e sintomas antes e após o tratamento endodôntico com óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> 20% v/v com Tween 20 a 0,02% identificado por meio de exames subjetivos, objetivos e radiológicos e levedura isolada.....	100

1. INTRODUÇÃO

A infecção do sistema de canais radiculares ocorre como resultado da atividade múltipla de microrganismos que desempenham um importante papel no desenvolvimento e manutenção das patologias que acometem a polpa e a região periapical. Turk e colaboradores em 2008 relataram que mais de 300 espécies de microrganismos podem ser encontradas no interior de um canal radicular infectado. Dentre os microrganismos relatados pelos pesquisadores têm-se as bactérias Gram positivas, Gram negativas, aeróbias facultativas ou anaeróbias estritas. Pode-se ainda ser encontrados fungos e vírus (Sunde et al., 2002; Adib et al., 2004; Cavalcante et al., 2011).

Enterococcus faecalis entre as bactérias e *Candida albicans* entre os fungos são os microrganismos mais frequentes nas alterações endodônticas, principalmente quando se refere às infecções secundárias e ao aparecimento de lesões perirradiculares. Esses microrganismos podem estar associados ou serem isolados de canais radiculares em cultura pura (Sunde et al., 2002; Adib et al., 2004; Lins et al., 2010 e Cavalcante et al., 2011).

Apesar dos pesquisadores realizarem estudos no sentido de eliminar as bactérias presentes no canal radicular mas do que as leveduras (Beatrice et al., 2008), *C.albicans* em infecções endodônticas tem recebido atenção especial devido ao seu aparecimento tanto em infecções primárias quanto refratárias e apesar de aparecerem em menor número que as bactérias, essas leveduras apresentam mecanismos de adaptação a uma variedade de condições (Ruff et al., 2006 e Lins et al., 2010).

1.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* é classificado como fungo imperfeito na divisão Deuteroromycotina, classe Blastomycetes, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae*. Caracteriza-se por ser unicelular, eucariota, heterotrófica, tendo como substância de reserva o glicogênio e reprodução por brotamento

unipolar. Algumas espécies têm a propriedade de formar estruturas filamentosas como hifas e pseudohifas sendo esta característica um obstáculo à fagocitose, principal mecanismo de defesa dessa levedura (Kurtzmann e Fell, 1998; Lacaz et al., 2002).

Na maioria dos pacientes a infecção por esta levedura é decorrente principalmente do reservatório endógeno tais como a mucosa bucal e esofágica (Delgado & Aguirre, 1997; Menezes et al., 2006 e Wingeter et al., 2007).

Este gênero possui fatores de virulência, como capacidade de adesão e a produção de exoenzimas. Outras propriedades dessa levedura no processo patogênico é a formação de tubo germinativo, a variabilidade fenotípica (Samaranayake, 1992; Biswas, 2000), a capacidade de formar hifas e pseudohifas, como mecanismo de escape da fagocitose, produção de metabólitos alergênicos, os quais podem desencadear manifestações de hipersensibilidade tanto do tipo imediato, quanto do tipo tardio. Entretanto o progresso da infecção está relacionado com uma combinação de fatores, como a virulência da cepa e as desordens imunológicas do hospedeiro (Lacaz et al, 2002; Grubb et al., 2009; Rorig et al., 2009).

A adesão é um pré-requisito para a transformação da levedura de saprófita a patogênica. *C. albicans*, como muitos microrganismos patogênicos possuem enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou prejudicam a integridade da membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção ou interrupção das atividades, uma vez que as membranas contêm lipídeos e proteínas, constituindo-se em alvo do ataque enzimático (Pires, 2001).

A produção de exoenzimas reflete o grau de patogenicidade de *C. albicans*. A exoenzima fosfolipase atua na hidrólise dos fosfolipídios dando origem a lisofosfolipídios, que causam dano à célula epitelial. A exoenzima proteinase é capaz de degradar vários substratos, tais como queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular (Mitrovic et al., 1995).

Foi observado *in vitro* que leveduras do gênero *Candida* são capazes de se ligarem a superfícies inertes, como, metacrilato (resina de dentadura) e a outras resinas e polímeros, empregados em vários materiais médicos e

odontológicos. Tais superfícies, uma vez contaminadas, podem atuar como uma importante fonte de levedura que podem levar as candidíases sistêmicas (Netea et al., 2008).

C. albicans pode estar presente nas patologias pulpares tanto na fase de tratamento quanto após a obturação dos canais radiculares, sendo responsáveis, por recidivas que levam a necessidade de retratamento do canal, pois as substâncias químicas auxiliares não agem sobre algumas amostras dessas leveduras (Figura 1).

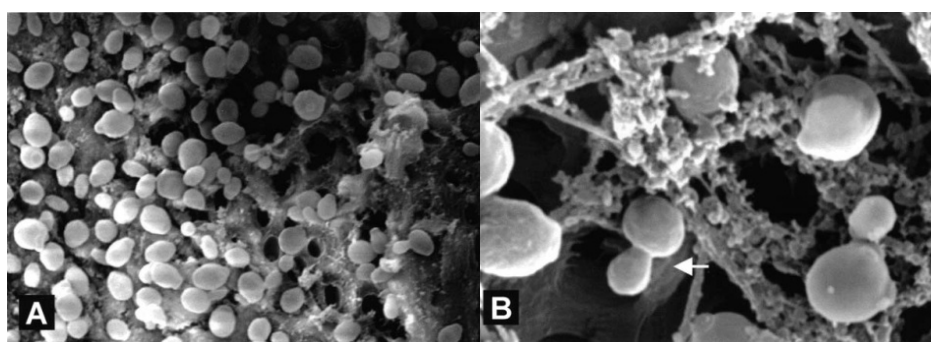


Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* na dentina:

A - magnificação 1900 X e **B** - magnificação 5000X.
(fonte: Siqueira et. al., 2002)

O emprego de produtos naturais na clínica odontológica tem sido justificado pelo uso popular, por seu baixo custo e pelo adequado efeito antimicrobiano e anti-inflamatório (Oliveira et al., 2007). Para Nascimento e colaboradores (2007), os produtos naturais apresentam maior atividade antimicrobiana quando na formulação de óleos essenciais, justificada pela maior concentração de princípios ativos e pela natureza lipídica da substância. A natureza lipossolúvel dos óleos essenciais e de seus constituintes permite a interação com estruturas celulares que tem constituição lipídica, resultando no aumento da permeabilidade das membranas, o que pode provocar desequilíbrio eletrolítico e morte celular.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais foi observada em vários estudos. Assim, as propriedades biológicas desses extratos vegetais devem ser avaliadas de modo a investigar novas possibilidades de constituição

de soluções irrigadoras (Hammer et al. 1999, 2003 a e b, 2004 e Almeida et al 2010).

Hammer e colaboradores (2004) mostraram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (*tea tree*) foi capaz de inibir a formação de tubos germinativos em *C. albicans* e a capacidade de adesão à resina.

1.2 *Melaleuca alternifolia* Cheel

Melaleuca alternifolia Cheel conhecida como *Tea Tree* ou árvore de chá é uma espécie arbórea da família Myrtaceae nativa da Austrália. Podem atingir sete metros de altura, têm uma casca fina e folhas longas e pontiagudas, que quando partidas, emitem um aroma forte (Carson et al., 2006).

As propriedades medicinais da *M. alternifolia* são conhecidas e utilizadas a centenas de anos pela tribo australiana de aborígenes *Bundialung*. Esta tribo tinha o hábito de tomar o chá das folhas desta planta para praticamente qualquer doença. Eles mascavam as folhas destas árvores para ajudar a curar gripes e infecções de garganta, nadavam em lagoas rodeadas por *Tea trees* e a chamavam de *healing lakes* (lagoas da cura). Esta planta só passou a ser conhecida no ocidente a partir de 1770 com as expedições do capitão James Cook. O botânico Josef Banks membro desta expedição estudou as propriedades medicinais dessa planta e a batizou de *Tea Trees* (Figura 2 A e B), (Silva et al., 2002; Hammer et al., 2003 a).

O principal produto da *M. alternifolia* é o óleo essencial, que possui comprovada ação antimicrobiana e anti-inflamatória entre outras. Por ser uma espécie natural na Austrália, lá se concentram os principais produtores e fornecedores desse óleo (aproximadamente 400 toneladas/ano). Ele tem sido consumido pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de limpeza, sendo os principais centros consumidores América do Norte e a Europa (Castro et al., 2005).



Fonte: <http://www.australianplants.com>

Figura 2 A, B *Melaleuca alternifolia* Cheel - A: hábito arbóreo; B: folhas e floração

1.2.1 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

A denominação de óleo essencial refere-se a um complexo de substâncias naturais, extraídas de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água. São constituídos de numerosos compostos voláteis, com tensões de vapor elevadas, odoríferos e insolúveis em água (Simões, 2007).

O óleo essencial de *M. alternifolia* varia de incolor ao amarelado, tem um aroma que lembra eucalipto. Obtido das folhas, o óleo pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol que são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana. O cineol é um conhecido irritante da pele e o terpinenol é apontado como o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes. O óleo de boa qualidade contém quantidade entre 2 a 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinenol. (Hammer et al., 2003; Carson et al., 2006).

O óleo essencial de *M. alternifolia*, *Tea Tree Oil* é um potente antisséptico, antibacteriano, antifúngico e parasiticida natural, não tóxico e não irritante para os tecidos, muito testado clínica e laboratorialmente (Mondello et al., 2003, Halcón e Milkus, 2004 e Carson et al., 2006).

As propriedades antimicrobianas do óleo essencial vêm da combinação de diferentes compostos. Geralmente é o resultado de um efeito combinado de compostos ativos e inativos. Os compostos inativos podem influenciar a velocidade das reações e biodisponibilidade dos compostos ativos (Oliveira, 2007).

Em 1920 dentistas australianos utilizavam o óleo essencial de *M. alternifolia* para desinfetar tesouras e bisturis e observaram ser efetivo na prevenção de infecções. Na segunda guerra mundial este óleo fazia parte dos kits de primeiros socorros de médicos do exército australiano. Esse óleo era colocado o mais rápido possível em ferimentos para proteger contra infecções. Na época foi considerado tão importante que os produtores desse óleo foram dispensados do serviço militar para produzi-lo durante a guerra. Após este período e com a chegada de medicamentos sintéticos passou a ser produzido apenas para o mercado local, sendo redescoberto nos anos de 1990. (Tenney, 1996).

Produtos farmacêuticos para uso externo com o óleo essencial de *M. alternifolia* é muito utilizado para o tratamento de acne; caspa; onicomicoses; infecções cutâneas; desinfecção de superfícies; higiene das mãos entre muitos outros (Reichling et al., 2004; Carson et al., 2006).

Reichling e colaboradores em 2004 pesquisaram a eficiência do creme de *tea tree* a 10% contra dermatite purulenta aguda em 57 cães e afirmaram que após 10 dias de tratamento houve uma taxa de sucesso de 71%. No décimo dia ocorreu significativa redução dos sintomas comparados ao grupo controle.

Sherry e colaboradores em 2001 descrevem um caso de fratura na tíbia com osteomielite crônica por *Staphylococcus aureus* resistentes a antibioticoterapia intravenosa, realizada por dois anos. Quando a amputação era a alternativa tratou-se a mesma com uma mistura de óleos essenciais de *Eucaliptus glóbulos*, *M. alternifolia* e *Eugenia caryophyllus*. Após três meses os tecidos haviam se recuperado e o sintoma regredido e as culturas para bactéria foram negativas.

Em 1998 o óleo essencial de *M. alternifolia* quando comparado com o fluconazol para o tratamento de uma candidíase recorrente em pacientes imunodeprimidos foi uma alternativa eficiente nesse tratamento já que a *Candida sp* não respondia ao fluconazol (Carson et al., 1998; Vasquez et al., 2000).

Autores relatam ser esse óleo essencial reconhecidamente eficaz na inibição de diversos tipos de microrganismos, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus níger*, *Streptococcus pyogenes*, entre outros (Oliveira et al., 2007; Hammer et al., 2004).

1.3 Polpa dental

A polpa dental esta localizada no interior da câmara pulpar; é formada por um feixe vâsculo-nervoso; se encontra delimitada pelas paredes inelásticas da dentina, que conferem proteção pulpar enquanto permanece íntegra. A polpa dental tem funções nutritivas, reparadoras, sensoriais, formativas e defensivas. Quando exposta a agentes microbianos, químicos ou mecânicos, esta responde com uma inflamação, a pulpíte, que pode tanto regredir para a cura quanto evoluir para uma necrose, dependendo da intensidade do agente agressor e da resposta do hospedeiro.

1.4 Necrose Pulpar

A cárie é considerada a maior fonte de microrganismos em infecções da polpa e da área periapical. A necrose pulpar ocorre porque os mecanismos de defesa do organismo não conseguem eliminar os microrganismos presentes na lesão cariosa do sistema de canais radiculares. A polpa dental reage a lesão de cárie antes de ser alcançada pelos microrganismos. Produtos microbianos, ácidos orgânicos e enzimas

são frequentemente encontrados nos túbulos dentinários, tais produtos causam inflamação, podendo dar início ao processo de necrose pulpar (Tronstad et al., 1987).

A necrose pulpar é o resultado final de alterações irreversíveis ocorridas no tecido pulpar, representando a cessação de atividade metabólica deste. Esta pode ocorrer de três maneiras distintas:

- *necrose de coagulação* aonde ocorre morte dos tecidos pulpares devido ao bloqueio do suprimento sanguíneo,
- *Necrose por liquefação* é a forma em que os tecidos pulpares se tornam úmidos e amolecidos,
- *Gangrena*, tipo mais freqüente que ocorre após a sequência de alterações inflamatórias da polpa, geralmente está associada a infecção bacteriana e é causada pela combinação de isquemia e infecção bacteriana.

Na necrose pulpar, os microrganismos se encontram em posição privilegiada no interior do canal radicular uma vez que os mecanismos de defesa não conseguem alcançá-los já que o suprimento sanguíneo foi comprometido. Assim os microrganismos encontram um excelente nicho para multiplicação.

Assim como a cárie representa a principal fonte de agressão microbiana para a polpa dental, o canal radicular infectado constitui a fonte principal de agressão microbiana para os tecidos periapicais. (Jorge 2007).

O tratamento fundamenta-se na remoção do tecido necrosado e dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares. A composição microbiana de um canal radicular infectado é determinada pela via na qual, estes ganham acesso ao canal, pela disponibilidade de nutrientes e pelas interrelações entre microrganismos.

Na microbiota das patologias pulpares são frequentemente encontrados, os seguintes microrganismos: *Streptococcus sanguis*, *S. miteor*, *S.salivarius*, *S faetidus* (enterococos), *S. pyogenes*, *Staphylococcus*

aureus, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterias*, *Bactérias produtores de pigmento negro* e *Porfiromonas gingivalis* e *P. endodontales*, *Actinomyces* e *Candida albicans* (Jorge 2007).

No interior dos canais radiculares *C. albicans* esta presente nos casos de polpa morta colonizando o sistema de canais radiculares e destruindo os tecidos periapicais com as bactérias, mas também pode sobreviver como único microrganismo, possuindo a versatilidade de sobreviver em extremos de pH, representando um problema no tratamento padrão dos canais radiculares (Siqueira e Sen, 2004).

O principal propósito do tratamento endodôntico de polpa morta é a desinfecção do sistema de canais radiculares. Muitas vezes microrganismos viáveis permanecem no interior do canal após o preparo biomecânico e associado a condições favoráveis de crescimento podem impedir o processo de reparação e causar o fracasso desse tratamento. Microrganismos que sobrevivem aos procedimentos, químico e mecânico desse tratamento podem rapidamente aumentar seu número entre as sessões de tratamento.

Estudos mostram que leveduras como *C.albicans* presentes nas patologias pulpares são responsáveis, em grande parte, por recidivas que levam a necessidade de retratamento do canal, pois as substâncias químicas auxiliares não agem sobre algumas amostras dessas leveduras. (Siqueira, 2002).

1.5 Tratamento endodôntico

O tratamento de canal é preconizado quando a pulpíte apresenta um quadro irreversível de polpa viva (Biopulpectomia) ou quando há necrose pulpar (Necropulpectomia).

Na Necropulpectomia o objetivo é retirar os restos necróticos da polpa e descontaminar os tecidos que a envolvem modelando a câmara pulpar de forma a receber o material obturador.

Pode ocorrer nesse processo a necrose parcial da polpa no sentido corono-radicular permanecendo a porção apical ainda viva, fazendo com que haja processo inflamatório com conseqüente sintomatologia dolorosa.

Durante o tratamento de canal são utilizadas substâncias químicas auxiliares que agem como antimicrobianos, irrigantes, lubrificantes e detergentes, bem como medicamentos de espera que são ministrados entre as sessões e tem como função a descontaminação, analgesia, manutenção dos tecidos remanescentes e do periápice, remineralização e a antissepsia da câmara pulpar (Paiva e Antoniazzi, 1991).

Os medicamentos mais utilizados atualmente são: Hidróxido de Cálcio P. A, Paramonoclorofenol Canforado, Formocresol, Paraformaldeído, Timol, Cresatina, Otosporin Clorexidina, Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP); Fosfato de Dexametasona, Paramonoclorofenol e Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (NDP). Apesar de apresentarem um ótimo efeito antimicrobiano não há um fármaco capaz de reunir todos os requisitos necessários para a resolução de todas as intercorrências endodônticas. Vale ressaltar que o Formocresol e o Paramonoclorofenol Canforado podem provocar uma reação inflamatória no periápice, que é a principal causa do desconforto pós-operatório relatado pelos pacientes (Oliveira et al., 2010).

As substâncias químicas auxiliares mais utilizadas são o hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, uréia e anestésicos. Os lubrificantes são o Endo PTC e o EDTA e como detergente pode-se citar o EDTA-t e o Tergentol entre outras (Chandra et al., 2010).

Atualmente se observa uma maior utilização de plantas medicinais e produtos de origem natural na terapia de algumas doenças. No ano de 2006 o Sistema Único de Saúde (SUS) aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que visa desenvolver toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos, para atender aos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso, recomendando a Fitoterapia. O documento propõe a implementação de ações e serviços relativos à

Fitoterapia/Plantas Medicinais pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, nos sistemas de atenção à saúde (Brasil 2006). O Ministério da Saúde (MS) publicou em março de 2010 uma portaria que instituiu as Farmácias Vivas, responsáveis pelo cultivo de plantas e manipulação de medicamentos fitoterápicos, dentro do Sistema Único de Saúde (SUS).

Na odontologia não é diferente, esses produtos vem despertando interesse de sua utilização em várias áreas (Bretz, 1998, Cavalcante et al, 2011 e Zohreh et al, 2012).

Existem várias pesquisas na avaliação da atividade antifúngica de produtos naturais frente a leveduras do gênero *Candida* dentre eles podemos ressaltar óleos essenciais, extratos aquosos e alcoólicos de diversas plantas e compostos produzidos por animais (Alves et al., 2000; Silva, 2004; Polachini, 2004; Oliveira, 2005; Alves et al., 2006 e 2009; Lima et al., 2006; Abrahão, 2007; Oliveira, 2007; Silva, 2007; Almeida et al., 2008; Alves et al., 2008; Molina et al., 2008; Costa et al., 2009 e 2010; Almeida et al., 2010; Cavalcante et al., 2011).

O óleo essencial de *M. alternifolia* se enquadra no grupo de medicamentos naturais a serem escolhidos por terapeutas de diversas áreas da saúde e a comunidade científica tem buscado cada vez mais estas aplicações.

Espera-se com esta pesquisa contribuir com a Saúde Pública, com mais um produto de baixo custo, de fácil acesso e com afinidade pelos tecidos do corpo humano e com poucas contraindicações. Espera-se também encontrar em uma única substância o maior número de propriedades necessárias para o sucesso do tratamento endodôntico, melhorando assim, a qualidade de vida dos pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre *Candida albicans*, no interior do canal radicular *in vitro* e como medicação intracanal em pacientes com necrose pulpar.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans*, na ausência e na presença de tensoativos e solvente.
- Avaliar *in vitro* a atividade de tensoativos e solvente sobre *C. albicans*.
- Determinar e comparar a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase, em isolados de *C. albicans*, antes e após contato com o óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel.
- Comparar as características fenotípicas (franjas) de isolados de *C. albicans*, antes e após contato com o óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel.
- Avaliar *in vitro* a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel no interior de canais radiculares de dentes contaminados com *C. albicans*.
- Aplicar a concentração do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel com atividade fungicida em pacientes sob tratamento endodôntico e acompanhar durante o tratamento a ocorrência de leveduras no interior do canal radicular.
- Avaliar *in vitro* a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre leveduras isoladas durante o tratamento endodôntico e comparar a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e características fenotípicas das leveduras antes e após contato com o óleo essencial.

3. METODOLOGIA

3.1 *Candida albicans*

Cepas padrão de *C. albicans* foram obtidas da micoteca do Laboratório de Leveduras Patogênicas da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

- ATCC 90028

- *C. albicans* (ICB 12 A) - *The London School of Hygiene & Tropical Medicine*;

A cepa padrão de *C. albicans* ICB-12A têm mostrado resultados reprodutíveis nos testes em laboratório. É mantida liofilizada em freezer a - 80 ° C e em óleo mineral em ágar Sabouraud-dextrose.

3.2 Isolados de *C. albicans*

C. albicans utilizadas neste estudo foram da micoteca do Laboratório de Leveduras Patogênicas da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Embora previamente identificadas como *C. albicans* estas foram reidentificadas utilizando-se as provas para pesquisa de tubo germinativo (teste de Reynolds – Braude), cultivo em lâmina, testes para assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e teste de fermentação de açúcares, descritos segundo a técnica de Kreger van Rij, 1984, Kurtzemann & Fell, 1998 e protocolo da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB-USP (anexo 8).

3.3 Pesquisa de fatores de virulência

➤ Produção de exoenzimas - Proteinase e Fosfolipase

A produção de proteinase e fosfolipase foi avaliada antes e após contato com o óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel.

A proteinase foi avaliada segundo a técnica descrita por Ruchel *et al* (1982) (Meio Base: ágar (Difco) 18,0 g; água destilada 900,0 mL. Este meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Meio de albumina; *yeast carbon base* (Difco) 11,7 g; albumina bovina fração V (Sigma) 2,0 g; protovit (manipulado por Farmácia Bueno Ayres, SP-Brasil) 2,5 mL; água destilada 100,0 mL. Este meio foi esterilizado por filtração em membranas, Milipore de 0,22 mm. O meio básico esterilizado foi resfriado a 50°C, adicionou-se o meio de albumina e em seguida a mistura foi distribuída em placas de Petri em volume de 20 mL).

A atividade enzimática da proteinase foi observada pela formação de um halo ao redor da colônia (PZ). PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de degradação (zd) $\Rightarrow PZ = dc/dc + zd$.

A fosfolipase foi avaliada conforme descrita por Price *et al* (1982). (Meio de emulsão de ovo: gema de ovo 80,0 g; solução fisiológica 80,0 mL. Os ovos foram deixados em álcool a 70% durante uma hora para serem desinfetados. Em seguida as gemas foram separadas e colocadas em um recipiente estéril contendo pérolas de vidros, pesadas e adicionadas a solução salina 0,9%, agitando-se em vortex. Meio ágar fosfolipase: peptona (Difco) 10,00g; glicose (Synth) 20,00 g; cloreto de sódio (Reagen) 53,30 g; cloreto de cálcio (Reagen) 0,55 g; ágar (Difco) 20,00 g; água destilada 1000,00 mL. O meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Ao ágar resfriado a 50°C foi adicionada uma emulsão de ovo. Volume de 20mL foi distribuído em placas de Petri.

A atividade enzimática da fosfolipase é observada pela formação de um halo de precipitação ao redor da colônia (PZ). PZ é igual à razão entre o

diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de precipitação (zp) $\Rightarrow PZ = dc/dc + zp$.

Após contato com o óleo essencial a pesquisa de produção das exoenzimas foi realizada nas concentrações sub-inibitórias nas cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A e de cada isolado testado. Como controle de produção das exoenzimas, isolados sem o contato com o óleo essencial foram avaliados simultaneamente. As amostras foram semeadas em pontos equidistantes de cada placas de Petri contendo o meio específico para cada enzima. Todas as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 72hs.

Os resultados foram classificados de acordo com Price *et al.*, 1982:

Índice 1 - $Pz = 1,0$ = Ausência de atividade enzimática

Índice 2 - $1,0 < Pz \leq 0,64$ = Atividade enzimática positiva

Índice 3 - $Pz < 0,64$ = Atividade fortemente positiva

➤ **Tipagem fenotípica (Morfortipagem) (Pongpaichit,1987- modificado por Hunter et al.,1989).**

A tipagem fenotípica foi avaliada antes e após contato com o óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel utilizando ágar extrato de malte (extrato de malte, (Merck) 60,0 g, ágar (Dífico) 20,0g e água destilada 1000mL. O meio foi esterilizado a 120°C por 20 minutos e distribuído em placas de Petri (20 mL em cada placa). Suspensões de colônias de *C. albicans* com 48 horas de cultivo em ágar Sabouraud dextrose a 25 °C, com turvação correspondente ao tubo nº 3 da escala de McFarland, foram utilizadas como inóculo. Com o auxílio de “swabs” estéreis, as suspensões de *C. albicans* foram inoculadas (3 a 4 por placa) na superfície do ágar extrato de malte, e em seguida, incubadas a 25 °C por 10 dias.

Os resultados foram avaliados segundo os aspectos macromorfológicos da franja e superfície das colônias de tal modo que resulte em um biótipo composto por quatro dígitos, de acordo com o modelo de tipificação de Hunter et al (1989). 1º Franja – distribuição: Ausente (0);

Descontínua (>20% da margem) (1); Descontínua (21 a 50% da margem) (2); Descontínua (51 a 90% da margem) (3); Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); Contínuas com filamentos paralelos (7). 2º Franja- comprimento: Ausente (0); Igual ou menor do que 2mm (2), De 3 a 5 mm (3); Igual ou maior do que 6 mm (5). 3º Franja – Textura: Ausente (0); Muito grosseira (1); Intermediária (3); Fina (4). 4º Superfície – Topografia: Lisa (0); Nodular (1); Escavada (2); Crateriforme (4); Crateriforme com dobras e pregas (5); Dobras ou pregas (6); Pêlos (8).

3.4 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

O óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel também conhecido por *Tea tree* foi adquirido comercialmente da empresa “Thursday Plantation Health Ltda” (Ballina NSW Austrália)

3.4.1 Análise Cromatográfica: Cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CGMS)

A análise cromatográfica foi realizada na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas - CPQBA / UNICAMP.

Preparação da amostra – 100 ml de óleo essencial de *M. alternifolia* foram pesados analiticamente em balão volumétrico de 5 ml e o volume completado com acetato de etila. Volume injetado – 1 µL.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas HP-5975. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 mm x 0,25 mm x 0,25 mm) com hélio como gás de arraste (1,0 ml × min⁻¹). As temperaturas do injetor e detector foram 220°C e 250°C respectivamente, com uma programação de temperatura para a coluna de 60°C a 240°C (3°C×min⁻¹). Uma mistura de n-alcanos foi usada para o cálculo de índice de retenção (IR) dos analitos e a identificação

dos mesmos foi feita pelo IR, comparação com a biblioteca eletrônica NIST e com dados da literatura (Adams, 2007).

3.5 Tensoativos e solventes

Foram avaliados os tensoativos polissorbato Tween 20 (Sigma) e polissorbato Tween 80 (Sigma) que são polissorbatos, ou tensoativos hidrofílicos, geralmente solúveis ou dispersáveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo em água, como dispersantes ou solubilizantes de óleos. É um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas e o solvente DMSO (Tedia-Brazil) (dimetilsulfóxido), a partir de 10.000µg/mL (100%) em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) sobre as cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A.

Tween 20 (Sigma) (polissorbato 20) e Tween 80 (Sigma) (polissorbato 80) também foram avaliados sobre as cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% em meio RPMI e DMSO (Sigma) na concentração de 0,5; 1 e 2% (Nascimento et al 2007);

Para o ensaio com todos os isolados o meio de cultura RPMI-1640 foi previamente preparado com os tensoativos ou solventes nas seguintes concentrações: Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) na concentração de 0,02 % e DMSO na concentração de 1% (Nascimento et al 2007).

Após contato com esses agentes foram realizadas a pesquisa de produção de exoenzimas e morfotipagem nas doses subinibitória, conforme técnica descrita em 3.3.

3.5.1 Pesquisa da interferência dos polissorbatos Tween 20 (polissorbato 20), Tween 80 (polissorbato 80) e solvente dimetilsufóxido DMSO sobre as cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A

➤ Preparação da suspensão de *C. albicans*

Cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Difco- USA), a 37°C. As suspensões foram preparadas a partir de uma cultura de 24 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Pfaller et al., 1988). A 1 mL destas suspensões em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultura RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) ajustando-se as suspensões finais para $0,5 - 2,5 \times 10^5$ UFC /mL.

➤ Ensaio *in vitro* da interferência dos polissorbatos Tween 20 (polissorbato 20), Tween 80 (polissorbato 80) e DMSO nas cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A.

Após preparação das suspensões de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A os ensaios foram realizados em placas de microdiluição de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300 uL. Foram colocados em cada poço 100 uL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e 100 µL do tensoativo ou solvente e realizada a diluição seriada na base dois até o 24^o poço e por último adicionou-se 100 uL da suspensão da levedura a cada poço. Esses testes foram realizados em duplicata e a microplaca selada com Parafilm "M"® e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

➤ Controles

Foi utilizado um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo

do meio mais cada tensoativo ou solvente e um controle positivo para crescimento da levedura (meio RPMI-1640 + suspensão da levedura)

➤ **Leitura das placas de microdiluição**

A avaliação da sensibilidade de *C. albicans* na microplaca foi realizada 24 horas após a incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi observada na microplaca e o resultado definido, como a menor concentração inibitória da substância capaz de inibir o crescimento das amostras testadas.

3.6 Pesquisa *in vitro* da atividade do óleo essencial de *M.*

***alternifolia* Cheel sobre *C. albicans* sem adição de tensoativos e solvente.**

➤ **Preparações da suspensão de leveduras**

Os isolados e as cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. A suspensão dos isolados e das cepas padrão *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A foram preparados a partir de uma cultura de 24 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Pfaller et al., 1988). A 1 mL desta suspensão em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) ajustando-se a suspensão final para $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC /mL.

➤ **Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans*.**

Os ensaios foram realizados em microplacas, de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300µL. Em cada poço foi colocado uma solução de 100µL de meio RPMI- 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)

acrescido ou não de tensoativo ou solvente de escolha, até o 24^o poço. No primeiro poço foi colocado 100µL do óleo essencial a ser testado a partir de 80.000µg/mL (100%). A partir do segundo poço, 100µL do mesmo produto foi homogeneizado e diluído em série, na “base 2” até 24^o poço. Na sequência foram distribuídos em cada poço 100µL da suspensão da levedura de cada amostra. As placas foram seladas com Parafilm “M”® e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

➤ **Controles**

Em uma placa de microdiluição foi utilizado um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI -1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo para o óleo essencial e um controle positivo para cada levedura (meio + inoculo). A placa foi selada com Parafilm “M”® e incubada em estufa a 37°C por 24 horas.

➤ **Leitura das placas de microdiluição**

A avaliação da sensibilidade de *C. albicans* na microplaca foi realizada 24 horas após a incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi observada na microplaca e o resultado assim definidos:

- CIM-50 que representa a concentração inibitória mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- CIM-90 que representa a concentração inibitória mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

➤ **Pesquisa da atividade fungistática e fungicida do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans*.**

Também pode se expressar em termos de concentração fungicida mínima CFM, considerada como a menor concentração da substância capaz de levar a morte do fungo (Cury,1998), após 24 horas.

A avaliação dessa atividade fungistática ou fungicida do óleo essencial foi realizada em placas de Petri com ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO), semeando-se 5µL das quatro diluições anteriores ao poço com inibição do crescimento fúngico. As placas de Petri com os inóculos foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

O resultado da concentração fungicida mínima (CFM) obtida foi analisada e assim definidos:

- CFM-50 que representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- CFM-90 que representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

3.7 Pesquisa *in vitro* da atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel acrescido de tensoativos e solvente sobre *C. albicans*.

Os tensoativos Tween 20 (Sigma) (polissorbato 20) e Tween 80 (Sigma) (polissorbato 80) foram avaliados na concentração de 0,01; 0,02 e 0,04% em meio RPMI e o solvente DMSO (Sigma) na concentração de 0,5; 1 e 2% (Nascimento et al 2007) sobre duas amostras de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).

Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) na concentração de 0,02 % e DMSO na concentração de 1% (Nascimento et al 2007), foram as concentrações utilizadas para o ensaio com todas as amostras de *C. albicans*. Os ensaios foram realizados em microplacas conforme descrito no item 3.6.

➤ Controles

Foi utilizado um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, um controle negativo do meio acrescido do emulsificador, um controle positivo para crescimento da levedura (meio RPMI-

1940 + suspensão da levedura) e um controle positivo para crescimento da levedura (meio RPMI-1940 + agente emulsificador + suspensão da levedura)

➤ **Leitura dos testes de sensibilidade**

A leitura dos testes de CIM e CFM foram realizadas conforme descritos no item 3.6.

3.8 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans* no interior do canal radicular

Foram selecionados 60 dentes humanos, doados e unirradiculares, portadores de rizogênese completa, extraídos por razões diversas, sem tratamento endodôntico, vivo ou morto e não fraturado. Cálculo dental e outros eventuais resíduos aderidos às superfícies radiculares externas foram criteriosamente removidos com o auxílio de curetas periodontais. Estes dentes foram acondicionados em tubos de polipropileno, contendo solução salina e mantidos sob refrigeração até o uso.

Esses dentes tiveram as coroas removidas com o uso de discos de aço acoplados à caneta de baixa rotação, sob constante refrigeração. Posteriormente, tomadas radiográficas foram realizadas a fim de verificar a existência de canal único e reto e sem calcificações ou reabsorções internas.

➤ **Preparo do dente**

Seguindo a metodologia de Paisano (2004), os canais foram preenchidos com solução fisiológica estéril e com o uso de lima K, nº 15 foi realizado o esvaziamento do conteúdo. O comprimento foi determinado pela introdução de lima tipo K de fino calibre com limitador de silicone até que sua guia de penetração alcance o forame apical. Foi subtraído 1 mm desse valor, aferido com régua milimetrada. Estabelecida essa extensão longitudinal, realizamos o preparo químico-cirúrgico com limas tipo K e irrigação com 50 ml

de solução fisiológica esterilizada a cada troca de instrumento, preparando-se os canais até a lima # 45. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução de EDTA-T seguida de 100 mL de solução salina sob ação de vibração ultrassônica. A superfície externa das raízes foi então impermeabilizada com adesivo instantâneo cianoacrilato (Super Bonder®). Após a instrumentação, os dentes foram colocados em tubos de polipropileno contendo solução fisiológica e esterilizados em autoclave a 121°C durante vinte minutos, Em cabine de fluxo laminar foram secos com auxílio de compressas de gaze e cones de papel absorvente previamente esterilizados, seus forames apicais selados com cera e inseridos em suportes estéreis confeccionados especificamente para a realização deste experimento sendo a quantidade de 10 dentes por suporte.

➤ **Critério de seleção das amostras de *C. albicans*.**

Foram selecionadas 4 amostras de *C. albicans* sendo uma amostra ATCC 90028 altamente produtora de proteinase e fosfolipase, uma amostra (número 2) não produtora de proteinase e de fosfolipase e amostra número 23 altamente produtora de proteinase e amostra número 56 altamente produtora de fosfolipase

➤ **Ensaio *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans* no interior do canal radicular**

Os 60 dentes foram divididos em doze grupos, cada grupo de cinco dentes colocados em suporte conforme Figura 3. Inicialmente foi introduzido nos canais radiculares dos dentes, uma suspensão de leveduras preparada conforme item 3.6 selecionadas para cada teste conforme o grupo. Os dentes foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas.

Após esse período foi adicionado óleo essencial de *M. alternifolia* em diferentes concentrações conforme o grupo e Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP) no grupo controle. Novamente incubados em estufa a 37° por mais 24 horas.

Grupo I

Foi colocado apenas o meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) – controle negativo do meio de cultura e após 24 horas, acrescido do meio RPMI 1640.

Grupo II

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 - controle positivo e após 24 horas, acrescido do meio RPMI 1640.

Grupo III

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 100% (80.000µg/mL).

Grupo IV

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP) - Controle.

Grupo V

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10% (8.000µg/mL).

Grupo VI

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 0,78% (625µg/mL) (CFM).

Grupo VII

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 2 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10% (8.000µg/mL)..

Grupo VIII

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 2 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 0,39% (312,5µg/mL) (CFM).

Grupo IX

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 23 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10%(8.000µg/mL).

Grupo X

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 23 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 0,09% (78,125µg/mL) (CFM).

Grupo XI

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 56 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10% (8.000µg/mL).

Grupo XII

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 56 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 1,56% (1.250µg/mL) (CFM)

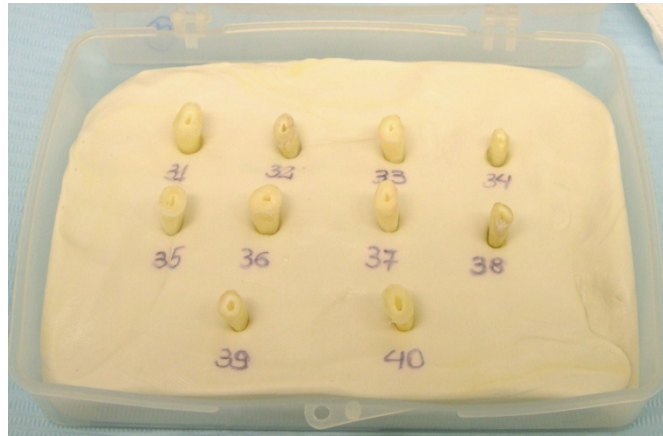


Figura 3 - Suporte com 2 grupos de 5 dentes

➤ **Avaliação *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel frente a *C. albicans* no interior do canal radicular**

Para avaliar a atividade do óleo essencial foi retirado o conteúdo de cada canal radicular com cone de papel e este semeado em placas contendo Ágar Sabouraud-glicose incubada por 24 horas a 37°C. Após este período observou-se a ausência ou a presença de crescimento de colônias de *C.albicans*.

3.9 Pacientes

Foram estudados 10 pacientes adultos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, não portadores de doença mental que tiveram diagnóstico de necrose pulpar em um ou mais dentes virgens de tratamento endodôntico e que consentiram voluntariamente em participar da pesquisa, após devidamente esclarecidos, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Nestes pacientes foi aplicado solução de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel a uma concentração a 20% acrescido de Tween 20 a

0,02% (Nascimento et al 2007). Foi realizado um relatório de cada paciente e a cada atendimento (Anexo 9).

Não participaram do estudo os pacientes que relataram alergia ou reações ao uso de produtos derivados de eucalipto, portador de doença mental e que não tiveram diagnóstico de necrose pulpar em um ou mais dentes ou já apresentaram tratamento endodôntico e se recusaram a participar da pesquisa, mesmo após devidamente esclarecidos e não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

O grupo controle foi formado por 10 pacientes adultos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, não portador de doença mental e que tiveram diagnóstico de necrose pulpar em um ou mais dentes virgens de tratamento endodôntico e consentiram voluntariamente em participar da pesquisa, após devidamente esclarecidos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Estes foram submetidos ao tratamento endodôntico com Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP).

➤ **Coleta das amostras, isolamento e identificação das leveduras e tratamento.**

O(s) dente(s) envolvido(s) foram devidamente isolado(s) do meio bucal por lençol de borracha para evitar contato com a saliva ou outras secreções (Paiva, Antoniazzi, 1988).

Foi realizado exame radiográfico de diagnóstico por meio de radiografia periapical do(s) dente(s) afetados.

Em seguida uma cirurgia de acesso foi realizada e imediatamente após uma coleta com cone de papel absorvente estéril introduzido no(s) canal(ais) afetado(s), por vinte segundos.

Após a coleta, o cone foi semeado em Ágar Sabouraud-glicose com 200µg/mL de cloranfenicol e mantido em estufa a 37°C por 7 dias para

pesquisa de leveduras que se positivas foram isoladas e identificadas utilizando-se as provas para pesquisa de tubo germinativo (teste de Reynolds – Braude), cultivo em lâmina, testes para assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e teste de fermentação de açúcares, descritos segundo a técnica de Kreger van Rij, 1984, Kutzeman & Fell, 1998 e protocolo da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB-USP (anexo 3). No caso de ausência de leveduras as culturas foram mantidas por 30 dias para confirmar a negatividade.

Após a coleta, ainda na mesma sessão o canal foi tratado conforme protocolo usual utilizando-se hipoclorito de sódio á 2,5%, mudando apenas a medicação de demora a ser ministrada, no caso óleo essencial de *M. alternifolia*, que ficou agindo por uma semana, na concentração a 20% v/v com tween 20 a 0,02 %. No caso dos controles a medicação de demora foi o Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP).

Depois de 7 dias o dente foi reaberto e uma nova coleta realizada. Uma nova semedura para verificar a ocorrência da redução ou ausência de leveduras. Para obturação foi usado o cimento Sealer 26 - Dentsply ®.

➤ **Avaliação *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre as leveduras isoladas no interior do canal radicular de paciente em tratamento**

As leveduras isoladas e identificadas foram submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro* com o óleo essencial de *M. alternifolia* conforme item 3.6. A produção de exoenzimas e a tipagem fenotípica foram avaliadas com e sem a presença do óleo essencial de *M. alternifolia* conforme item 3.3.

3.10 Controle de qualidade e biossegurança

Todas as preparações e análises foram realizadas pelos mesmos técnicos utilizando-se os equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, avental, máscara, óculos e equipamentos de proteção coletiva como cabine de segurança biológica, bico de Bunsen e capela de exaustão.

3.11 Descarte de resíduos

Todos os resíduos gerados das análises microbiológicas, no presente estudo seguiram as normas de descarte estabelecidas pelo plano de gerenciamento de resíduos do Instituto Adolfo Lutz.

3.12 Considerações Éticas

Este trabalho (32/2009) seguiu as recomendações da resolução 196/96. Foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (Anexos 1, 2, 3, 4 e 5)

4. RESULTADOS

4.1 *Candida albicans*.

Os 64 isolados de leveduras foram reidentificados como *Candida albicans*, 100% (64/64) apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeos.

A tabela 1 mostra o número de isolados biológicos e das cepas padrão de *Candida albicans*

Tabela 1. Número de isolados biológicos de origem humana e das cepas padrão de *Candida albicans*

<i>C. albicans</i>	CEPA PADRÃO ATCC 90028	CEPA PADRÃO ICB 12 A	ISOLADOS BIOLÓGICOS DE ORIGEM HUMANA
Número de cepas padrão e isolados	1	1	64

4.1.1 Fatores de virulência

4.1.1.1 Atividade enzimática - Produção de exoenzimas: Proteinase e Fosfolipase

Na tabela 2 observa-se a produção de proteinase e fosfolipase das cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e ICB 12 A .

Tabela 2. Atividade enzimática (Pz): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de cepas padrão de *Candida albicans*

Cepas Padrão	Proteinase Pz*	Indice	Fosfolipase Pz	Indice	Morfotipos**
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,46	3	0,58	3	7334
<i>C. albicans</i> ICB 12 A	0,36	3	0,60	3	7525

* Atividade enzimática: Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Indice:1)
1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Indice: 2)
Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Indice: 3)

** Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Phongpaichi, 1987- modificado por Hunter et al.,1989

Trinta e nove isolados de *C.albicans* (39/64) (Tabela 3) apresentaram produção de proteinase e fosfolipase fortemente positiva (índice 3). A média de produção de proteinase para os 64 isolados foi de Pz $0,44 \pm 0,24$ e para fosfolipase Pz $0,58 \pm 0,21$ (Tabela 4).

Tabela 3. Atividade enzimática (PZ): produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e morfotipos de isolados de *Candida albicans*

Isolados de <i>C.albicans</i>	Proteinase Pz*	Índice	Fosfolipase Pz*	Índice	Morfotipos
1	1,00	1	0,53	3	7325
2	1,00	1	1,00	1	7534
3	0,59	3	0,38	3	1236
4	0,36	3	0,67	2	5345
5	0,44	3	0,33	3	2245
5	0,50	3	0,54	3	7528
7	0,47	3	1,00	1	2338
8	0,32	3	0,43	3	3325
9	0,40	3	0,44	3	7325
10	0,30	3	0,27	3	7538
11	0,30	3	0,36	3	3325
12	0,45	3	0,50	3	1241
13	1,00	1	1,00	1	7342
14	0,38	3	1,00	1	3344
15	0,44	3	0,64	2	1320
16	0,24	3	1,00	1	2330
17	0,26	3	1,00	1	2335
18	0,35	3	1,00	1	7541
19	0,35	3	0,50	3	3235
20	0,38	3	0,56	3	7240
21	0,45	3	0,36	3	7516
22	0,31	3	0,43	3	1240
23	0,33	3	1,00	1	7328
24	0,50	3	0,43	3	5245
25	0,29	3	0,43	3	7334
26	0,38	3	0,50	3	5345
27	0,27	3	1,00	1	7240
28	0,18	3	1,00	1	1230
29	0,30	3	0,50	3	7320
30	0,33	3	0,67	2	0001

31	0,40	3	0,46	3	5242
32	0,28	3	0,40	3	0004
33	0,27	3	0,55	3	1232
34	0,35	3	0,45	3	2232
35	1,00	1	0,54	3	5232
36	0,43	3	0,38	3	5232
37	0,27	3	0,60	3	7544
38	1,00	1	0,50	3	1240
39	0,36	3	0,70	2	7520
40	0,29	3	0,42	3	7344
41	0,27	3	0,55	3	7541
42	0,33	3	0,43	3	3342
43	1,00	1	0,46	3	7344
44	0,46	3	0,50	3	7242
45	1,00	1	0,43	3	3342
46	0,38	3	0,56	3	7542
47	0,57	3	0,40	3	7340
48	0,33	3	0,60	3	7240
49	0,22	3	0,50	3	7541
50	0,25	3	0,55	3	5341
50	0,50	3	1,00	1	7528
52	0,40	3	0,50	3	1241
53	0,38	3	0,46	3	7341
54	0,25	3	0,67	2	7341
55	0,30	3	0,46	3	7236
56	1,00	1	0,45	3	7338
57	0,31	3	0,69	2	7345
58	0,29	3	0,50	3	1246
59	0,27	3	0,46	3	7344
60	0,37	3	0,58	3	7341
61	0,35	3	0,55	3	5341
62	1,00	1	0,57	3	7538
63	0,40	3	0,50	3	7341
64	0,64	2	0,80	2	7334

*Atividade enzimática:

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 1)

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Índice: 2)

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 3)

** Código dos morfotipos de *C. albicans* conforme modelo de Pongpaichit,1987- modificado por Hunter et al.,1989

Tabela 4. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima de produção de proteinase e fosfolipase de isolados de *Candida albicans*.

Exoenzimas	PROTEINASE	FOSFOLIPASE
Isolados de <i>C.albicans</i>	N= 64*	N= 64
$\mu \pm dp$	0,44** \pm 0,24	0,58 \pm 0,21
Mediana	0,36	0,5
Min. – Max.	1 - 0,18	1 - 0,27

* Número de isolados

** Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática

1,0 < Pz \leq 0,64 = Atividade enzimática positiva

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

μ - Média de produção de proteinase e fosfolipase

dp – desvio padrão da produção de proteinase e fosfolipase

min-máx. – mínima e máxima da da produção de proteinase e fosfolipase

4.1.1.2 Morfotipos

As tabelas 2 e 3 apresentam os morfotipos das cepas padrão e dos isolados de *C. albicans*. Nos isolados 51,13% (34/64) apresentaram franjas contínuas com filamentos em paralelo (código 7) e destes 32,35% (11/34) apresentaram franjas de comprimento igual ou maior que 6 mm e 50% (17/34) apresentaram franjas de comprimento entre 3 e 5 mm (Tabela 3).

4.2 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi adquirido na empresa *Thursday Plantation Health* Ltda. (Ballina NSW Austrália) e tem a composição descrita na *International Organization of Standardization ISO 4730/2004* (Anexo 6).

4.2.1 Análise cromatográfica: Cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CGMS)

Na análise cromatográfica do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel identificou-se os compostos terpinen-4-ol (38,12%); gama terpineno (19,72%); alfa-terpineno (9,81%); para cimeno (3,62%); terpinoleno (3,52%); alfa-terpineol

(3,29%); limoneno (2,88%); e alfa-pineno (2,68%) entre outros (Quadro 1 e Figuras 4, 5 e 6). A análise cromatográfica foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas CPQBA – UNICAMP

Quadro 1 Compostos voláteis identificados no óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
5,064	926	alfa-tujeno	0,98
5,242	933	alfa-pineno	2,68
6,339	976	beta-pineno	0,69
6,695	990	beta-mirceno	0,74
7,117	1005	alfa-felandreno	0,45
7,533	1017	alfa-terpineno	9,81
7,765	1024	para-cimeno	3,62
7,900	1028	M = 136	1,69
7,976	1030	Limoneno	2,88
8,986	1059	gama-terpineno	19,72
9,969	1088	Terpinoleno	3,52
11,184	1120	M = 154	0,20
13,642	1181	terpin-4-ol	38,12
14,020	1191	alfa-terpineol	3,29
22,961	1406	alfa-gurjuneno	0,57
23,344	1416	trans-cariofileno	0,57
24,138	1435	Aromadendreno	1,92
24,331	1440	M = 204	0,23
25,003	1457	ALLO-aromadendreno	0,81
25,543	1470	M = 204	1,45
26,251	1488	cis-beta-guaieno	0,24
26,402	1492	alfa-selineno	1,72
26,612	1497	alfa-muuroleno	0,24
27,536	1521	delta-cadineno	2,59
27,844	1529	cadina-1,4-dieno	0,34
29,789	1579	M = 222	0,73
30,081	1587	Viridiflorol	0,26
30,172	1589	M = 222	0,28
31,253	1619	M = 204	0,28
31,463	1624	1-EPI-cubenol	0,39

a) tempo de retenção (em minutos);

b) índice de retenção;

c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma.

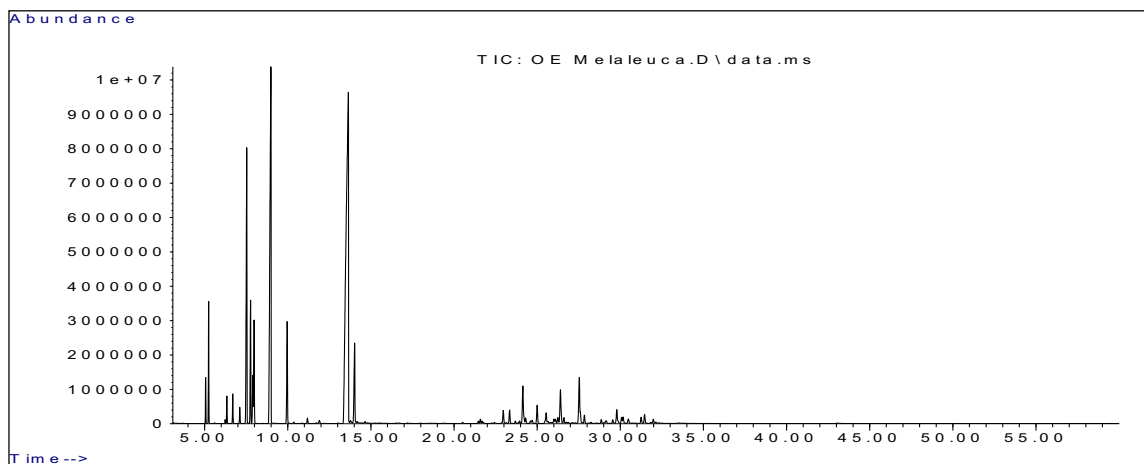


Figura 4 – Cromatograma do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

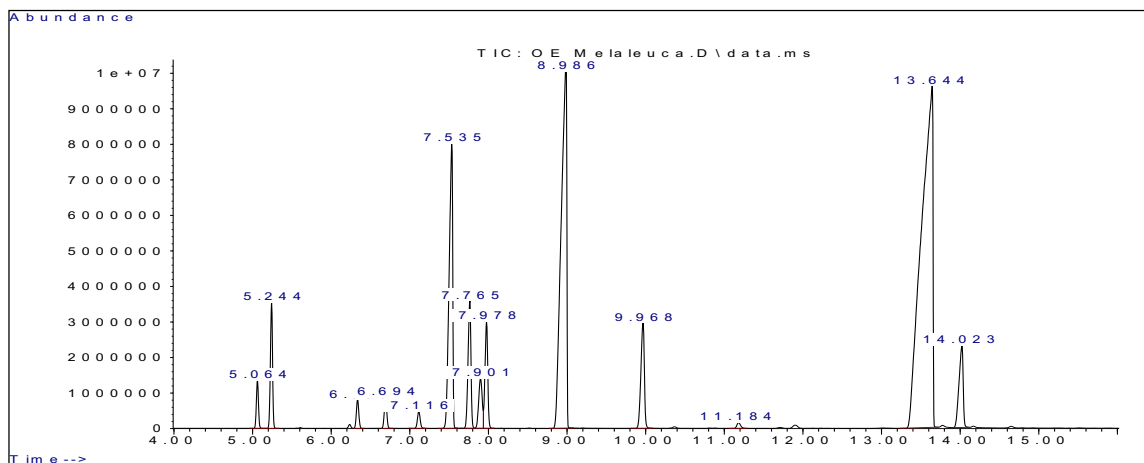


Figura 5 - Cromatograma expandido (4-16 min) do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

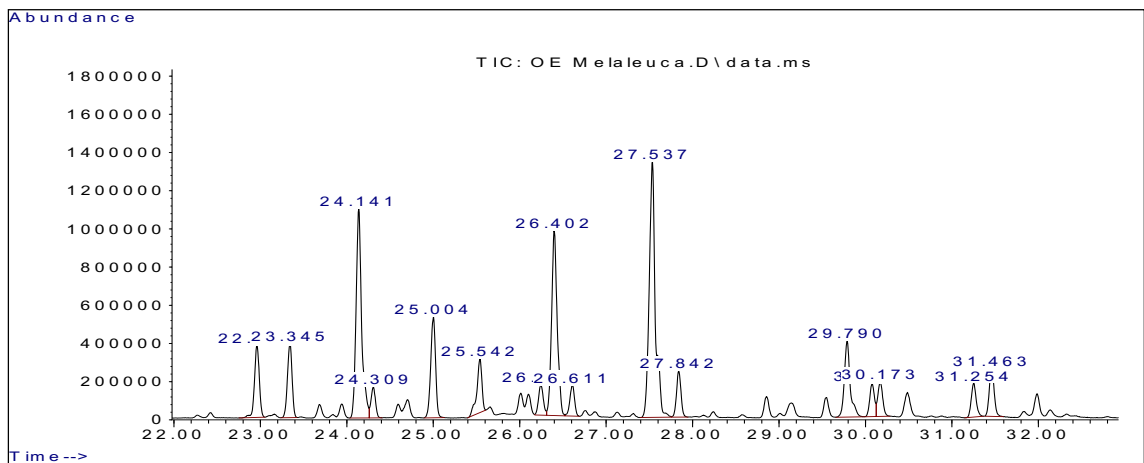


Figura 6– Cromatograma expandido (22-33 min) do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

4.3 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) na ausência de tensoativos e solvente.

A cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028 foi mais sensível ao óleo essencial de *M. alternifolia* 1,56% (1250 µg/mL) que a cepa padrão de *C. albicans* ICB 12 A 3,12% (2500 µg/mL) (Tabela 5). Nesta tabela pode-se observar ainda que na concentração subinibitória 0,78% (625 µg/mL) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel ocorreu inibição da produção de proteinase, fosfolipase e de formação de filamentação na cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028.

Tabela 5. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e sobre a atividade enzimática e morfotipos dessas leveduras na ausência de tensoativos e solvente.

Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Concentração do Óleo essencial sem Tensoativos e solvente*		Proteinase PZ**	Fosfolipase PZ	Morfotipos
Amostras	CIM*** % (v/v) - µg/mL	CFM**** µg/mL	Concentração 0,78% (v/v)-625 µg/ml	Concentração 0,78% (v/v)-625 µg/ml	Concentração 0,78% (v/v)-625 µg/mL
ATCC 90028	0,39 - 312,5	1,56 - 1250	1,0	1,0	0000
ICB - 12 A	1,56 - 1250	3,12 - 2500	0,8	0,57	7325

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL.
Pesquisa da atividade fungicida CFM em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas: ausência de crescimento atividade fungicida

**Pz: Atividade enzimática na concentração sub inibitória
Pz = 1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 1)
1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Índice: 2)
Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 3)

***CIM: concentração inibitória mínima

****CFM: concentração fungicida mínima
v/v: volume por volume em porcentagem

4.4 Atividade *in vitro* dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20), Tween 80 (polissorbato 80) e ao solvente DMSO sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A)

A tabela 6 apresenta a sensibilidade das cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) aos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20), Tween 80 (polissorbato 80) e ao solvente DMSO. Na pesquisa da atividade fungicida e fungistática observou ausência de atividade para Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e atividade fungicida entre 25% a 100% (2.500 a 10.000µg/mL) para o DMSO.

Tabela 6. Atividade dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre o crescimento de cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A)

Tensoativos e solvente	Tween 20		Tween 80		DMSO	
Amostras	CIM*** %(v/v) - µg/mL	CFM**** µg/mL	CIM %(v/v)	CFM µg/mL	CIM %(v/v)	CFM µg/mL
ATCC 90028	SA**		SA		25-100 2500 a 10000	25-100 2500 a 10000
ICB - 12 A	SA		SA		25-100 2500 a 10000	25-100 2500 a 10000

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL.
 Pesquisa da atividade fungicida CFM em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas: ausência de crescimento atividade fungicida

** SA: Sem atividade

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

v/v: volume por volume em porcentagem

4.5 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel acrescido de tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A)

As Tabelas 7, 9 e 11 apresentam a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* acrescido dos tensoativos Tween 20 (Sigma), (polissorbato 20) e Tween 80 (Sigma), (polissorbato 80), nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,04% e do solvente DMSO (Sigma) nas concentrações de 0,5; 1 e 2% sobre as duas cepas padrões de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A). Essas concentrações são indicadas no trabalho de Nascimento e colaboradores, (2007). O óleo essencial de *M. alternifolia* acrescido do tensoativo Tween 20 (Sigma), (polissorbato 20) nas concentrações 0,02 e 0,04% apresentou atividade fungicida na menor concentração do óleo essencial 0,19% (156,25 µg/mL) (Tabela 7).

As tabelas 8,10 e 12 apresentam a atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* acrescido dos tensoativos Tween 20 (Sigma), (polissorbato 20) e Tween 80 (Sigma), (polissorbato 80), nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,04% e do solvente DMSO (Sigma) nas concentrações de 0,5; 1 e 2% sobre a produção de proteinase e fosfolipase das duas cepas padrões de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A). Na concentração subinibitória o óleo essencial de *M. alternifolia* acrescido do tensoativo Tween 20 (Sigma), (polissorbato 20) nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% inibiu ou reduziu a produção das exoenzimas nestas amostras (Tabela 8).

Pelo exposto o tensoativo escolhido a ser acrescido ao óleo essencial no tratamento endodôntico dos pacientes foi o Tween 20 (polissorbato 20) na concentração a 0,02%. Para a análise da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima dos 64 isolados foram testados os tensoativos Tween 20 (Sigma) (polissorbato 20) e Tween 80 (Sigma) (polissorbato 80), na concentração a 0,02% e o solvente DMSO (Sigma) na concentração a 1%.

Tabela 7 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre o crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A)

Tensoativo	Tween 20 0,01%		Tween 20 0,02%		Tween 20 0,04%	
Cepas Padrão de <i>C. albicans</i>	CIM** CFM*** %(v/v) - µg/mL		CIM CFM %(v/v) - µg/mL		CIM CFM %(v/v) - µg/mL	
ATCC 90028	0,09-100 78,12-80.000	0,39 -100 312,5 – 80.000	0,09-100 78,12-80.000	0,19 -100 156,25-80.000	0,19 -100 - 0,19 -100 156,25-80.000	
ICB - 12 A	0,09-100 78,12-80.000	0,39 -100 312,5 – 80.000	0,09-100 78,12-80.000	0,19 -100 156,25-80.000	0,19 -100 - 0,19 -100 156,25-80.000	

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL.
Pesquisa da atividade fungicida CFM em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas: ausência de crescimento atividade fungicida

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

v/v: volume por volume em porcentagem

Tabela 8 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do tensoativo Tween 20 nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre a produção de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A)- concentração subinibitória.

Atividade enzimática	Tween 20 0,01%				Tween 20 0,02%				Tween 20 0,04%			
Cepas Padrão de <i>C. albicans</i>	Proteinase PZ*		FosfolipasePZ		Proteinase PZ*		FosfolipasePZ		Proteinase PZ*		FosfolipasePZ	
	CIM**	CFM ***	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90028	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ICB - 12 A	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	1,00	0,78	1,00	0,78	1,00	0,78

*Pz: Atividade enzimática na concentração sub inibitória

Pz = 1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 1)

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Índice: 2)

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 3)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

Tabela 9 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do tensoativo Tween 80 nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre o crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A).

Tensoativo	Tween 80 0,01%		Tween 80 0,02%		Tween 80 0,04%	
Cepas Padrão de <i>C. albicans</i>	CIM** % (v/v) - µg/mL	CFM*** µg/mL	CIM % (v/v) - µg/mL	CFM µg/mL	CIM % (v/v) - µg/mL	CFM µg/mL
ATCC 90028	12,50 -100 10.000-80.000	25-100 20.000-80.000	12,50 -100 10.000-80.000	25 -100 20.000-80.000	12,50 -100 10.000-80.000	25 -100 20.000-80.000
ICB - 12 A	0,78 – 100 625-80.000	6,25 – 100 5.000-80.000	6,25 – 100 5.000-80.000	12,5 - 100 10.000-80.000	12,50 -100 10.000-80.000	25-100 20.000-80.000

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL.
 Pesquisa da atividade fungicida CFM em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas: ausência de crescimento atividade fungicida

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

v/v: volume por volume em porcentagem

Tabela 10 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do tensoativo Tween 80 nas concentrações 0,01; 0,02 e 0,04% sobre a produção de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A) - concentração subinibitória.

Tensoativo	Tween 80 0,01%				Tween 80 0,02%				Tween 80 0,04%			
Cepas Padrão de <i>C. albicans</i>	Proteinase PZ*		FosfolipasePZ		Proteinase PZ*		FosfolipasePZ		Proteinase PZ*		FosfolipasePZ	
	CIM **	CFM ***	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90028	0,88-0,82	0,80-0,89	1,00-0,78	1,00	0,73-0,86	0,86-0,90	1,00	1,00	0,64-0,65	0,67-0,75	0,75-0,71	1,00
ICB - 12 A	0,78-0,82	0,80-0,89	0,83-0,75	1,00	0,73-0,86	0,86-0,90	0,83-0,75	1,00	0,64-0,75	0,67-0,75	0,80-0,75	1,00

*Pz: Atividade enzimática: na concentração sub inibitória

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 1)

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Índice: 2)

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 3)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

Tabela 11 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do solvente DMSO nas concentrações 0,5; 1 e 2% sobre o crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A).

Solvente	DMSO 0,5%		DMSO 1%		DMSO 2%	
Cepas Padrão de <i>C. albicans</i>	CIM** % (v/v)	CFM*** µg/mL	CIM % (V/v)	CFM µg/mL	CIM % (v/v)	CFM µg/mL
ATCC 90028	12,50 -100 10.000-80.000	25-100 20.000-80.000	12,50 -100 10.000-80.000	25-100 20.000-80.000	12,50 -100 10.000-80.000	25 -100 20.000-80.000
ICB - 12 A	1,56 – 100 1.250-80.000	3,12 – 100 2.500-80.000	1,56 – 100 1.250-80.000	3,12 – 100 2.500-80.000	3,12-100 2.500-80.000	6,25-100 5.000-80.000

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL.
Pesquisa da atividade fungicida CFM em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 24 horas: ausência de crescimento atividade fungicida

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

v/v: volume por volume em porcentagem

Tabela 12 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M alternifolia* Cheel acrescido do solve DMSO nas concentrações 0,5; 1 e 2% sobre a produção de proteinase e fosfolipase de *albicans* (ATCC 90028 e ICB – 12A)- concentração subinibitória.

Solvente	DMSO 0,5%				DMSO 1%				DMSO 2%			
Cepas Padrão de <i>C. albicans</i>	Proteinase PZ*		FosfolipasePZ		Proteinase PZ*		FosfolipasePZ		Proteinase PZ*		FosfolipasePZ	
	CIM **	CFM***	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90028	0,71	0,74	1,00	1,00	0,60	0,64	1,00	1,00	0,77	0,77	1,00	1,00
ICB - 12 A	0,50	0,57	1,00	1,00	0,63	0,62	0,57	0,75	0,57	0,82	0,82	1,00

*Pz: Atividade enzimática na concentração sub inibitória

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Indice: 1)

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Indice: 2)

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Indice: 3)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

4.6 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.

Não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia* conforme mostra a Tabela 13. Nesta pode-se observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência de tensoativos ou solvente a CIM e CFM variaram respectivamente de 0,09 a 6,25% (78,12 a 5000 µg/mL) e 0,19 a 6,25% (156,25 a 5000 µg/mL), com média e desvio padrão para CIM e CFM, respectivamente de $714,13 \pm 928,71$ µg/mL e $1233 \pm 977,96$ µg/mL (Tabelas 14 e 15) (Gráficos 1 e 2).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência de tensoativos e solventes é 312,5 µg/mL (0,39%) e 1250 µg/mL (1,56%) respectivamente e de CFM 50 e CFM 90 é respectivamente 1250 µg/mL (1,56%) e 2500 µg/mL (3,12%) (Tabela 16).

A produção de proteinase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência de tensoativos e solventes em 51 dos 58 isolados altamente produtores e reduziu a produção dessa enzima em sete isolados. Dos 66 isolados oito não eram produtores dessa enzima e a ausência de produção se manteve mesmo após contato com esse óleo essencial (Tabela 17).

A produção de fosfolipase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência de tensoativos e solventes em 22 isolados altamente produtores, reduziu a produção dessa enzima em 27 isolados, aumentou a produção em 6 isolados e dos 11 isolados não produtores 4 isolados passaram a produzir esta enzima após contato com o óleo essencial (Tabela 17).

A média de produção de proteinase para os 64 isolados e as duas amostras padrão era de $0,44 \pm 0,22$. Após contato com o óleo a média de produção passou a $0,97^{**} \pm 0,12$. Para a enzima fosfolipase a produção era de $0,58 \pm 0,20$ e após contato com o óleo a média passou para $0,81 \pm 0,10$ (Tabelas 18 e 19)

Quanto a produção de filamentos frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência de tensoativos e solventes, 13 isolados deixaram de filantar, 16 isolados tiveram a filimentação reduzida, 10 tiveram aumento da filimentação, 27 isolados não apresentaram alteração na filimentação em relação ao controle (Tabela 17).

Tabela 13 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 e Tween 80 na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre os isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).

Isolados	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sem tensoativos e solvente (µg/mL)*		óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 20 a 0,02% (µg/mL)*		óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 80 a 0,02% (µg/mL)		óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de DMSO a 1% (µg/mL)	
	CIM**	CFM***	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
C. albicans								
ATCC 90028	156,25	1250	156,25	625	156,25	1250	156,25	625
ICB 12A	1250	2500	156,25	312,5	156,25	625	156,25	625
1	625	625	39,06	78,12	4,88	39,06	156,25	625
2	78,12	156,25	19,53	312,5	4,88	78,12	156,25	1250
3	625	625	156,25	312,5	312,5	312,5	156,25	625
4	625	1250	19,53	156,25	156,25	312,5	312,5	1250
5	312,5	312,5	39,06	312,5	39,06	625	156,25	1250
6	1250	1250	78,12	156,25	156,25	312,5	156,25	625
7	312,5	625	156,25	2500	156,25	625	156,25	1250
8	312,5	312,5	39,06	312,5	156,25	1250	156,25	312,5
9	1250	312,5	156,25	1250	156,25	625	156,25	625
10	312,5	625	156,25	1250	156,25	312,5	156,25	625
11	312,5	625	39,06	156,25	156,25	312,5	156,25	312,5
12	312,5	1250	156,25	1250	312,5	312,5	156,25	312,5
13	312,5	625	156,25	625	312,5	1250	156,25	625
14	312,5	625	156,25	1250	156,25	625	156,25	312,5
15	312,5	1250	156,25	625	156,25	312,5	156,25	1250
16	312,5	1250	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	1250
17	312,5	1250	156,25	312,5	78,12	312,5	156,25	625
18	156,25	625	19,53	78,12	156,25	312,5	156,25	312,5
19	312,5	625	156,25	312,5	312,5	625	156,25	625
20	312,5	1250	156,25	312,5	312,5	1250	156,25	5000
21	312,5	1250	39,06	156,25	312,5	1250	156,25	1250
22	156,25	1250	156,25	312,5	625	1250	156,25	1250
23	156,25	625	19,53	78,12	312,5	1250	1250	2500

24	156,25	625	156,25	312,5	625	625	312,5	2500
25	156,25	1250	156,25	625	625	1250	312,5	2500
26	156,25	1250	156,25	312,5	625	1250	625	1250
27	156,25	1250	156,25	312,5	312,5	625	2500	2500
28	156,25	312,5	19,53	312,5	156,25	625	2500	156,25
29	156,25	312,5	625	1250	625	1250	5000	20000
30	156,25	1250	156,25	312,5	312,5	625	5000	10000
31	156,25	1250	19,53	312,5	312,5	625	625	5000
32	625	1250	156,25	1250	156,25	1250	1250	2500
33	1250	2500	312,5	1250	1250	1250	1250	5000
34	625	1250	156,25	312,5	312,5	1250	1250	5000
35	1250	2500	156,25	1250	156,25	625	2500	5000
36	625	1250	19,53	78,12	19,53	312,5	625	2500
37	1250	2500	19,53	156,25	78,12	312,5	1250	5000
38	1250	1250	156,25	312,5	156,25	625	2500	2500
39	1250	2500	156,25	312,5	156,25	312,5	1250	5000
40	1250	1250	156,25	312,5	156,25	312,5	625	10000
41	1250	2500	156,25	625	156,25	625	1250	10000
42	1250	2500	156,25	625	312,5	312,5	1250	5000
43	2500	2500	156,25	312,5	156,25	625	1250	5000
44	1250	2500	312,5	625	156,25	1250	2500	10000
45	5000	5000	312,5	625	625	1250	2500	10000
46	2500	2500	625	1250	156,25	1250	2500	5000
47	5000	5000	625	1250	156,25	312,5	2500	5000
48	625	1250	312,5	312,5	312,5	625	1250	2500
49	625	2500	156,25	312,5	156,25	312,5	2500	5000
50	312,5	625	39,06	156,25	156,25	312,5	78,12	312,5
51	312,5	312,5	39,06	156,25	625	625	39,06	625
52	1250	312,5	625	625	625	625	1250	10000
53	312,5	625	625	2500	1250	1250	625	2500
54	312,5	625	312,5	625	1250	1250	625	5000
55	312,5	312,5	625	1250	156,25	312,5	1250	5000
56	625	1250	625	1250	156,25	1250	1250	10000
57	312,5	1250	312,5	1250	156,25	312,5	625	5000
58	625	1250	312,5	625	1250	2500	1250	10000
59	312,5	625	156,25	312,5	156,25	312,5	625	1250
60	312,5	625	156,25	312,5	156,25	156,25	312,5	1250
61	312,5	625	312,5	312,5	156,25	312,5	625	2500
62	312,5	625	625	625	625	1250	312,5	1250
63	625	1250	156,25	1250	625	625	625	2500
64	312,5	625	156,25	625	156,25	625	625	1250

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar

Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento

atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM)

*concentração do óleo essencial de *M. alternifolia* com e sem adição de emulsificadores a 80.000µg/mL

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima

Tabela 14 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 e Tween 80 na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A).

VARIAVEIS	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sem tensoativos e solvente (µg/mL)*	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 20 a 0,02% (µg/mL)*	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 80 a 0,02% (µg/mL)	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido DMSO a 1% (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66	N=66	N=66
µ ± dp*	714,13 ± 928,71*	204,16 ± 179,72	318,45 ± 299,77	1000,36 ± 1045,30
Mediana	312,5	156,25	156,25	625
Min.–Max.****	78,12 – 5000	19,53 – 625	4,88 – 1250	39,06 – 5.000

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

**µ ± dp – Média e desvio padrão

***Min. – Mínima e Max. Máxima

Tabela 15 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 e Tween 80 na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.

VARIAVEIS	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sem tensoativos e solvente (µg/mL)*	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 20 a 0,02% (µg/mL)*	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 80 a 0,02% (µg/mL)	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido DMSO a 1% (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66	N=66	N=66
µ ± dp**	1233 ± 977,96*	612,8 ± 527,45	707,40 ± 461,31	3537,6 ± 3695,61
Mediana	1250	312,5	625	2500
Min.–Max.***	312,5 – 5000	78,12 – 2500	39,06 – 2500	156,25 – 20.000

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

**µ ± dp – Média e desvio padrão

***Min. – Mínima e Max. Máxima

Tabela 16 Valores CIM 50, CIM 90, CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido ou não dos tensoativos Tween 20 e Tween 80 na concentração a 0,02% e do solvente DMSO na concentração a 1% sobre e isolados biológicos e as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A)

Produtos	Concentração Inibitória Mínima		Concentração Fungicida Mínima	
	CIM 50* µg/mL - % (v/v)	CIM 90** µg/ml - % (v/v)	CFM 50 µg/mL - % (v/v)	CFM 90 µg/ml - % (v/v)
óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sem tensoativo e solvente	312,5 - 0,39	1250 - 1,56	1250 - 1,56	2500 - 3,12
óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 20 a 0,02%	156,25 - 0,19	312,5 - 0,39	312,5 - 0,39	1250 - 1,56
óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 80 a 0,02%	156,25 - 0,19	625 - 0,78	625 - 0,78	1250 - 1,56
óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de DMSO a 1%	625 - 0,78	2500 - 3,12	2500 - 3,12	5000 - 6,25

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em % e µg/mL

Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

CIM: concentração inibitória mínima

*CIM 50 CIM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CIM 90 CIM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

CFM: concentração Fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

v/v: volume por volume em porcentagem

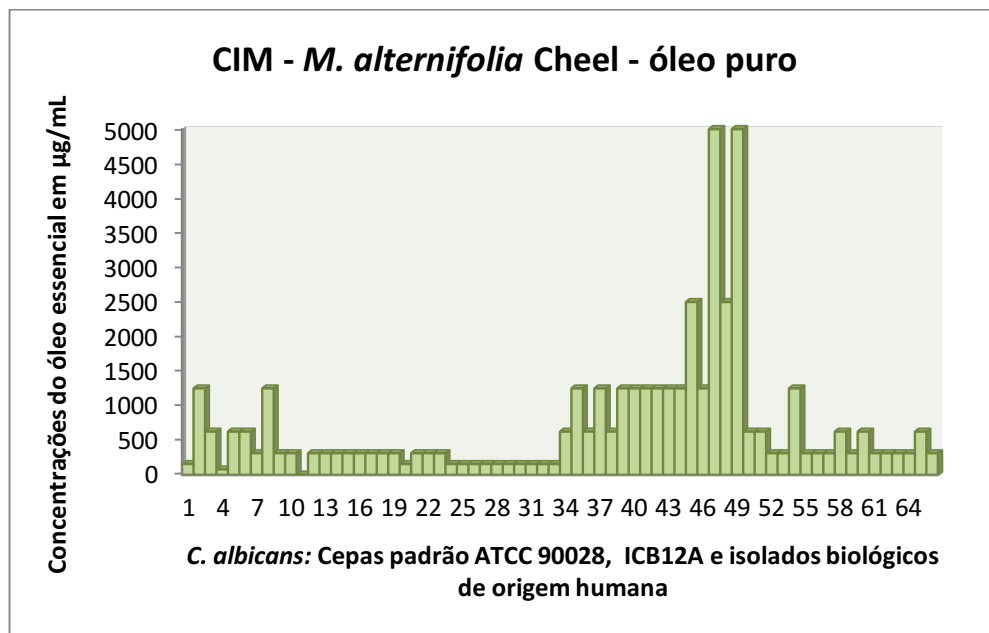


Gráfico 1 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência de tensoativos e solvente sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

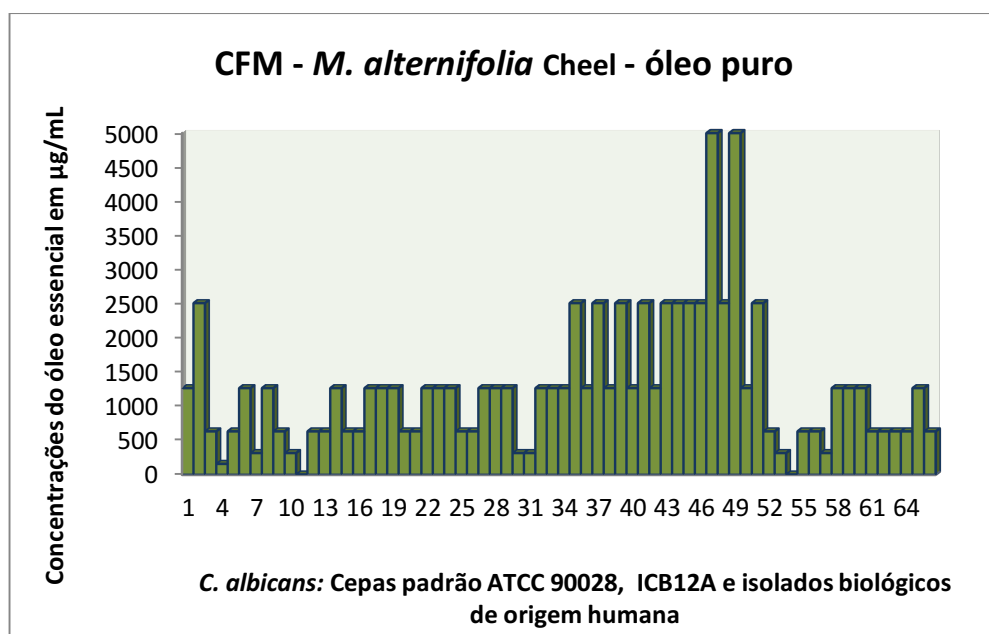


Gráfico 2 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência de tensoativos e solvente sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

Tabela 17 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na ausência de tensoativos e solvente.

Cepas Padrão Isolados	óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sem tensoativos e solvente		Proteinase ***CONTROLE	Proteinase Óleo essencial s/ tensoativo	Fosfolipase CONTROLE	Fosfolipase Óleo essencial s/ tensoativo	Morfotipos	Morfotipos
	Número	CIM* µg/mL	CFM** µg/mL	PZ	PZ	PZ	PZ	Controle
ATCC 90028	156,25	1250	0,46	1,00	0,58	1,00	7334	0000
ICB 12A	1250	2500	0,36	0,8	0,60	0,57	7525	7325
1	625	625	1,00	1,00	0,53	0,56	7325	1242
2	78,12	156,25	1,00	1,00	1,00	1,00	7534	7234
3	625	625	0,59	1,00	0,38	0,54	1236	7325
4	625	1250	0,36	0,67	0,67	1,00	5345	0002
5	312,5	312,5	0,44	1,00	0,33	1,00	2245	5341
6	1250	1250	0,50	1,00	0,54	1,00	7528	0000
7	312,5	625	0,47	0,67	1,00	0,80	2338	1330
8	312,5	625	0,32	1,00	0,43	0,35	3325	3322
9	1250	2500	0,40	1,00	0,44	0,64	7325	7521
10	312,5	625	0,30	1,00	0,27	0,57	7538	7338
11	312,5	625	0,30	1,00	0,36	0,75	3325	3234
12	312,5	1250	0,45	0,67	0,50	1,00	1241	1240
13	312,5	625	1,00	1,00	1,00	0,54	7342	1230
14	312,5	625	0,38	1,00	1,00	0,78	3344	1238
15	312,5	1250	0,44	1,00	0,64	0,56	1320	1240
16	312,5	1250	0,24	0,71	1,00	1,00	2330	5240
17	312,5	1250	0,26	1,00	1,00	1,00	2335	2335
18	156,25	625	0,35	1,00	1,00	1,00	7541	5240
19	312,5	625	0,35	1,00	0,50	1,00	3235	3234
20	312,5	1250	0,38	1,00	0,56	0,57	7240	1240
21	312,5	1250	0,45	1,00	0,36	0,67	7516	7316
22	156,25	1250	0,31	1,00	0,43	0,43	1240	0000
23	156,25	625	0,33	1,00	0,45	0,60	7328	7522
24	156,25	625	0,50	1,00	0,43	0,75	5245	0000
25	156,25	1250	0,29	1,00	0,43	1,00	7334	1240
26	156,25	1250	0,38	1,00	0,50	0,73	5345	7334
27	156,25	1250	0,27	1,00	1,00	0,71	7240	5246
28	156,25	312,5	0,18	1,00	1,00	1,00	1230	5341
29	156,25	312,5	0,30	1,00	0,50	1,00	7320	0000
30	312,5	1250	0,33	1,00	0,67	0,67	0001	7340
31	625	1250	0,40	1,00	0,46	1,00	5242	1241
32	625	1250	0,28	1,00	0,40	0,65	0004	0001

33	1250	2500	0,27	1,00	0,55	1,00	1232	1240
34	625	1250	0,35	1,00	0,45	0,78	2232	5240
35	1250	2500	1,00	1,00	0,54	0,69	5232	0001
36	625	1250	0,43	1,00	0,38	0,47	5232	7240
37	1250	2500	0,27	1,00	0,60	1,00	7544	0000
38	1250	1250	1,00	1,00	0,50	0,67	1240	0002
39	1250	2500	0,36	1,00	0,70	0,75	7520	0004
40	1250	1250	0,29	1,00	0,42	1,00	7344	5342
41	1250	2500	0,27	1,00	0,55	0,75	7541	5232
42	1250	2500	0,33	1,00	0,43	0,67	3342	0002
43	2500	2500	1,00	1,00	0,46	1,00	7344	7545
44	1250	2500	0,46	0,83	0,50	1,00	7242	7244
45	5000	5000	1,00	1,00	0,43	0,75	3342	5232
46	2500	2500	0,38	1,00	0,56	0,67	7542	7332
47	5000	5000	0,57	1,00	0,40	0,75	7340	5240
48	625	1250	0,33	1,00	0,60	0,82	7240	5244
49	625	2500	0,22	1,00	0,50	1,00	7541	7344
50	312,5	625	0,25	1,00	0,55	1,00	5341	5241
51	312,5	312,5	0,50	1,00	1,00	1,00	7528	7341
52	1250	2500	0,40	0,78	0,50	0,80	1241	0001
53	312,5	625	0,38	1,00	0,46	1,00	7341	7341
54	312,5	625	0,25	1,00	0,67	1,00	7341	7241
55	312,5	625	0,30	1,00	0,46	0,90	7236	1241
56	625	1250	0,42	1,00	0,45	1,00	7338	7241
57	312,5	1250	0,31	1,00	0,69	0,70	7345	3241
58	625	1250	0,29	1,00	0,50	0,71	1246	3241
59	312,5	625	0,27	1,00	0,46	1,00	7344	1241
60	312,5	625	0,37	1,00	0,58	0,55	7341	7521
61	312,5	625	0,35	1,00	0,55	0,79	5341	5241
62	312,5	625	1,00	1,00	0,57	1,00	7538	7538
63	625	1250	0,40	1,00	0,50	1,00	7341	0001
64	312,5	625	0,64	1,00	0,80	0,54	7334	5241

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL
 Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM)

*CIM: concentração inibitória mínima - resultado em µg/mL

**CFM: concentração fungicida mínima - resultado em µg/mL

***Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 18 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel - controle

Isolados biológicos e cepas padrão	Proteinase (controle)	Fosfolipase (controle)
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp$	0,44* \pm 0,22	0,58 \pm 0,20
Mediana	0,37	0,5
Min. – Max.	1- 0,18	1-0,27

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 19 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na ausência de tensoativos e solvente.

Isolados biológicos e cepas padrão	Proteinase (Óleo essencial s/ tensoativo)	Fosfolipase (Óleo essencial s/ tensoativo)
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp$	0,97* \pm 0,12	0,81 \pm 0,19
Mediana	1	0,78
Min. – Max.	1 - 0,67	1 - 0,35

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

4.7 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.

Não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia* conforme mostra a Tabela 13. Nesta pode-se observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) a CIM e CFM variaram respectivamente 0,024 a 0,78% (19,53 a 625 µg/mL) e 0,09 a 3,12% (78,12 a 2500 µg/mL), com média e desvio padrão para CIM e CFM, respectivamente de $204,16 \pm 179,72$ µg/mL e $612,8 \pm 527,45$ µg/mL (Tabelas 14 e 15) (Gráficos 3 e 4).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) é 156,25 µg/mL (0,19%) e 312,5 µg/mL (0,39%) respectivamente e de CFM 50 e CFM 90 é respectivamente 312,5 µg/mL (0,39%) e 1250µg/mL (1,56%) (Tabela 16).

A produção de proteinase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) em 50 dos 58 isolados altamente produtores e reduziu a produção dessa enzima em oito isolados. Dos 66 isolados oito não eram produtores dessa enzima e a ausência de produção se manteve mesmo após contato com esse óleo essencial na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) (Tabela 20).

A produção de fosfolipase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) em 50 isolados altamente produtores, inibiu a produção dessa enzima em 38 isolados, reduziu a produção em 18 isolados e dos 10 isolados não produtores 3 isolados passaram a produzir esta enzima após contato com o óleo essencial, na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) (Tabela 20).

A média de produção de proteinase para os 66 isolados era de $0,44 \pm 0,22$. Após contato com o óleo na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) a média de produção passou a $0,97 \pm 0,09$ Para a enzima fosfolipase a produção era de $0,58 \pm 0,20$ após contato com o óleo a média passou para $0,93 \pm 0,11$ (Tabelas 21 e 22)

Quanto a produção de filamentos frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20), um isolado deixou de filantar, 26 isolados tiveram a filamentação reduzida, 20 tiveram aumento da filamentação, 20 isolados não apresentaram alteração na filamentação em relação ao controle (Tabela 20).

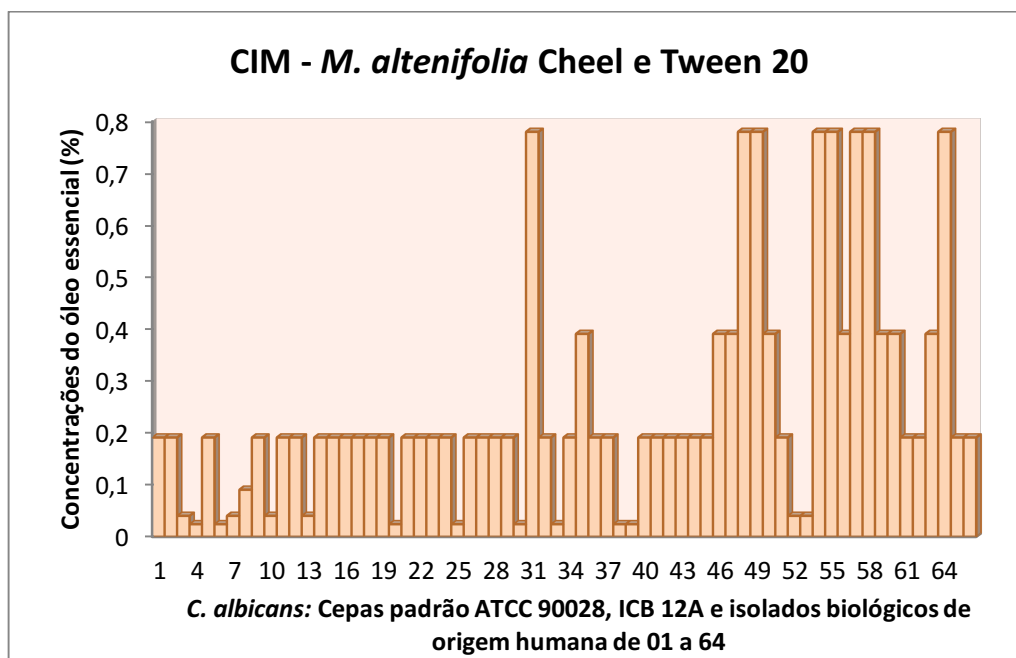


Gráfico 3 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 20 sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

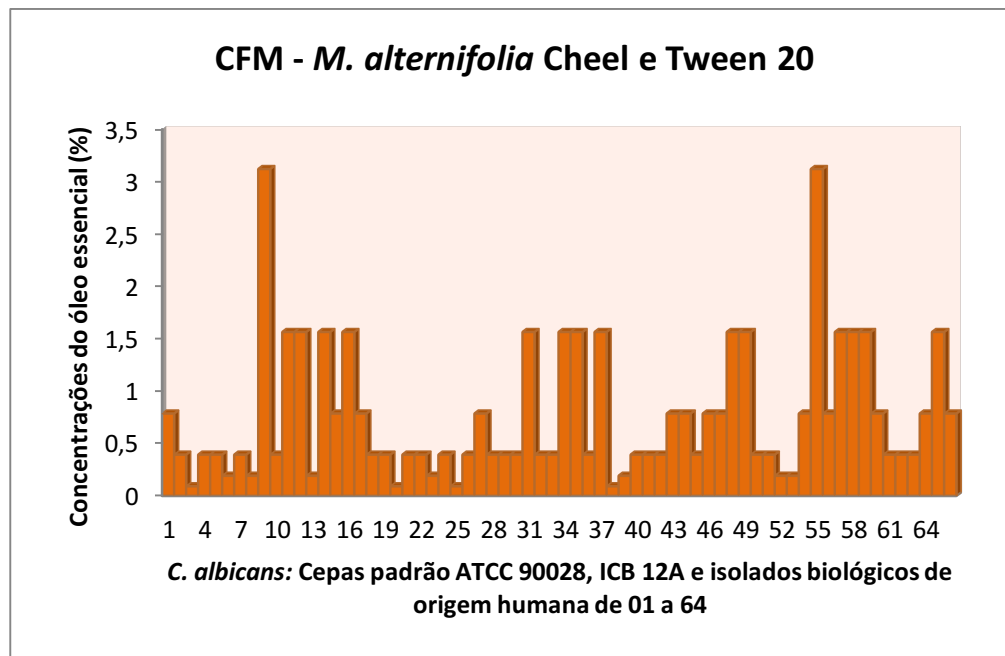


Gráfico 4 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 20 sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

Tabela 20 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20).

Cepas Padrão/ Isolados	Tween 20		Proteinase*** CONTROLE	Proteinase Tween 20	Fosfolipase CONTROLE	Fosfolipase Tween 20	Morfotipos	Morfotipos
	CIM* µg/mL	CFM** µg/mL	PZ	PZ	PZ	PZ	Controle	Tween 20
ATCC 90028	156,25	625	0,46	1,00	0,58	0,88	7334	7532
ICB 12a	156,25	312,5	0,36	1,00	0,60	1,00	7525	7525
1	39,06	78,12	1,00	1,00	0,53	1,00	7325	5331
2	19,53	39,06	1,00	1,00	1,00	0,75	7534	5540
3	156,25	312,5	0,59	1,00	0,38	1,00	1236	0001
4	19,53	156,25	0,36	1,00	0,67	0,78	5345	1240
5	39,06	312,5	0,44	1,00	0,33	1,00	2245	7518
6	78,12	156,25	0,50	1,00	0,54	1,00	7528	5340
7	156,25	2500	0,47	1,00	1,00	0,80	2338	7632
8	39,06	312,5	0,32	1,00	0,43	1,00	3325	7525
9	156,25	1250	0,40	1,00	0,44	1,00	7325	5531
10	156,25	1250	0,30	1,00	0,27	1,00	7538	5341
11	39,06	156,25	0,30	1,00	0,36	1,00	3325	7345
12	156,25	2500	0,45	1,00	0,50	1,00	1241	5341
13	156,25	625	1,00	1,00	1,00	1,00	7342	3531
14	156,25	1250	0,38	1,00	1,00	1,00	3344	5531
15	156,25	625	0,44	1,00	0,64	0,78	1320	7541
16	156,25	312,5	0,24	0,71	1,00	1,00	2330	5341
17	156,25	312,5	0,26	1,00	1,00	1,00	2335	1241
18	19,53	78,12	0,35	1,00	1,00	1,00	7541	5331
19	156,25	312,5	0,35	1,00	0,50	0,83	3235	7240
20	156,25	312,5	0,38	0,56	0,56	1,00	7240	2240
21	39,06	156,25	0,45	1,00	0,36	0,78	7516	5341
22	156,25	312,5	0,31	1,00	0,43	0,67	1240	0001
23	19,53	78,12	0,33	1,00	0,45	0,57	7328	7524
24	156,25	312,5	0,50	0,69	0,43	1,00	5245	5240
25	156,25	625	0,29	0,83	0,43	1,00	7334	0001
26	156,25	312,5	0,38	0,76	0,50	1,00	5345	7340
27	156,25	312,5	0,27	1,00	1,00	0,75	7240	5531
28	19,53	312,5	0,18	1,00	1,00	1,00	1230	3341
29	625	1250	0,30	1,00	0,50	0,86	7320	5540
30	156,25	312,5	0,33	1,00	0,67	1,00	0001	5540
31	19,53	312,5	0,40	1,00	0,46	1,00	5242	5344

32	156,25	1250	0,28	1,00	0,40	1,00	0004	5331
33	312,5	1250	0,27	1,00	0,55	1,00	1232	5531
34	156,25	312,5	0,35	1,00	0,45	1,00	2232	1631
35	156,25	1250	1,00	1,00	0,54	1,00	5232	7331
36	19,53	78,12	0,43	1,00	0,38	1,00	5232	5340
37	19,53	156,25	0,27	1,00	0,60	0,69	7544	7340
38	156,25	312,5	1,00	1,00	0,50	0,78	1240	7331
39	156,25	312,5	0,36	0,75	0,70	1,00	7520	7340
40	156,25	312,5	0,29	1,00	0,42	1,00	7344	7534
41	156,25	625	0,27	0,75	0,55	1,00	7541	5331
42	156,25	625	0,33	0,67	0,43	1,00	3342	7530
43	156,25	312,5	1,00	1,00	0,46	1,00	7344	1240
44	312,5	625	0,46	1,00	0,50	0,85	7242	3231
45	312,5	625	1,00	1,00	0,43	1,00	3342	3231
46	625	1250	0,38	1,00	0,56	1,00	7542	7530
47	625	1250	0,57	1,00	0,40	1,00	7340	5530
48	312,5	312,5	0,33	1,00	0,60	0,88	7240	2331
49	156,25	312,5	0,22	1,00	0,50	0,75	7541	7521
50	39,06	156,25	0,25	1,00	0,55	0,78	5341	7526
51	39,06	156,25	0,50	1,00	1,00	1,00	7528	7518
52	625	625	0,40	1,00	0,50	0,67	1241	5241
53	2500	10000	0,38	1,00	0,46	0,75	7341	7524
54	312,5	625	0,25	1,00	0,67	1,00	7341	7535
55	625	1250	0,30	1,00	0,46	0,90	7236	7334
56	625	1250	0,42	1,00	0,45	1,00	7338	7240
57	312,5	1250	0,31	1,00	0,69	0,82	7345	7340
58	312,5	625	0,29	1,00	0,50	1,00	1246	2240
59	156,25	312,5	0,27	1,00	0,46	1,00	7344	5340
60	156,25	312,5	0,37	1,00	0,58	1,00	7341	7516
61	312,5	312,5	0,35	1,00	0,55	1,00	5341	7526
62	625	625	1,00	1,00	0,57	1,00	7538	7510
63	156,25	1250	0,40	1,00	0,50	1,00	7341	5530
64	156,25	625	0,64	1,00	0,80	1,00	7334	5341

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL

Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM)

*CIM: concentração inibitória mínima

**CFM: concentração fungicida mínima

***Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 21 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel - controle

Variável - isolados biológicos de origem humana	Proteinase (controle)	Fosfolipase (controle)
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp$	0,44* \pm 0,22	0,58 \pm 0,20
Mediana	0,37	0,5
Min. – Max.	1- 0,18	1-0,27

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 22 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20).

Variável - isolados biológicos de origem humana	Proteinase com Tween	Fosfolipase com Tween 20
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp$	0,97* \pm 0,09	0,93 \pm 0,11
Mediana	1	1
Min. – Max.	1-0,56	1-0,57

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

4.8 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.

Não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia* conforme mostra a Tabela 13. Nesta pode-se observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) a CIM e CFM variaram respectivamente 0,0061 a 1,56% (4,88 a 1250 µg/mL) e 0,04 a 3,12% (39,06 a 2500 µg/mL), com média e desvio padrão para CIM e CFM, respectivamente de $318,45 \pm 299,77 \mu\text{g/mL}$ e $707,40 \pm 461,31 \mu\text{g/mL}$ (Tabelas 14 e 15) (Gráficos 5 e 6).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) é 156,25 µg/mL (0,19%) e 625 µg/mL (0,78%) respectivamente e de CFM 50 e CFM 90 é respectivamente 625 µg/mL (0,78%) e 1250 µg/mL (1,56%) (Tabela 16).

A produção de proteinase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) em 56 dos 58 isolados altamente produtores e reduziu a produção dessa enzima em dois isolados. Dos 66 isolados oito não eram produtores dessa enzima e a ausência de produção se manteve mesmo após contato com esse óleo essencial, presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) (Tabela 23).

A produção de fosfolipase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) em 27 isolados altamente produtores, reduziu a produção dessa enzima em 26 isolados, dos 10 isolados não produtores 2 passaram a produzir e 8 isolados continuaram não produtores 3 isolados não apresentaram mudanças na produção desta enzima após contato com o óleo essencial na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) (Tabela 23).

A média de produção de proteinase para os 66 isolados era de $0,44 \pm 0,22$. Após contato com o óleo na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) a média de produção passou a $0,99 \pm 0,03$. Para a enzima fosfolipase a produção era de $0,58 \pm 0,20$ e após contato com o óleo presença

do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80) a média passou para $0,87\pm 0,16$ (Tabelas 24 e 25)

Quanto a produção de filamentos frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80), 17 isolados deixaram de filantar, 21 isolados tiveram a filimentação reduzida, 11 tiveram aumento da filimentação, 15 isolados não apresentaram alteração e 2 isolados passaram a produzir filimentação em relação ao controle (Tabela 23).

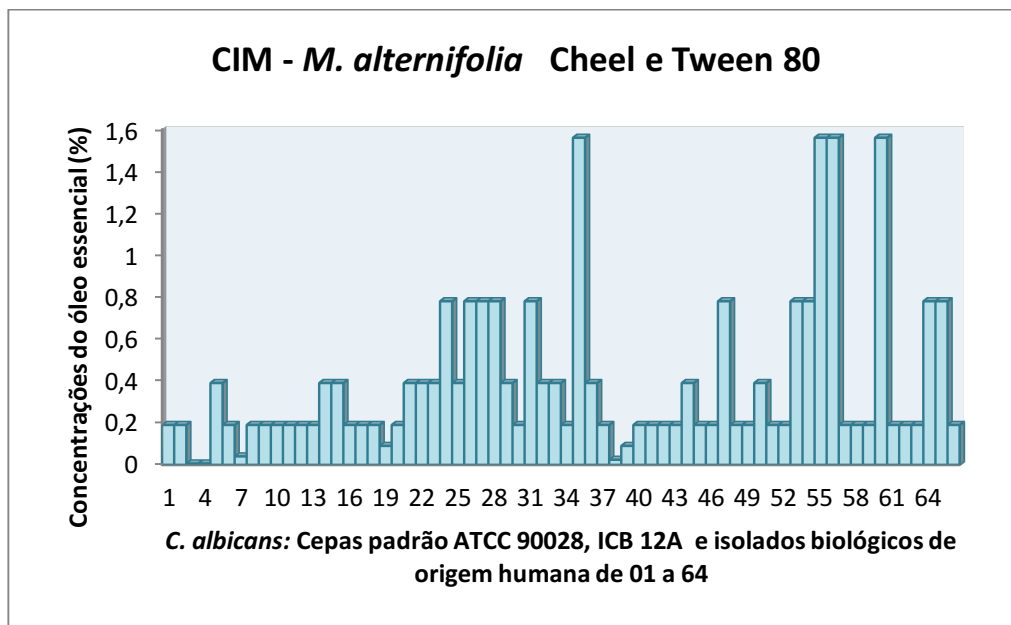


Gráfico 5 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 80 sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

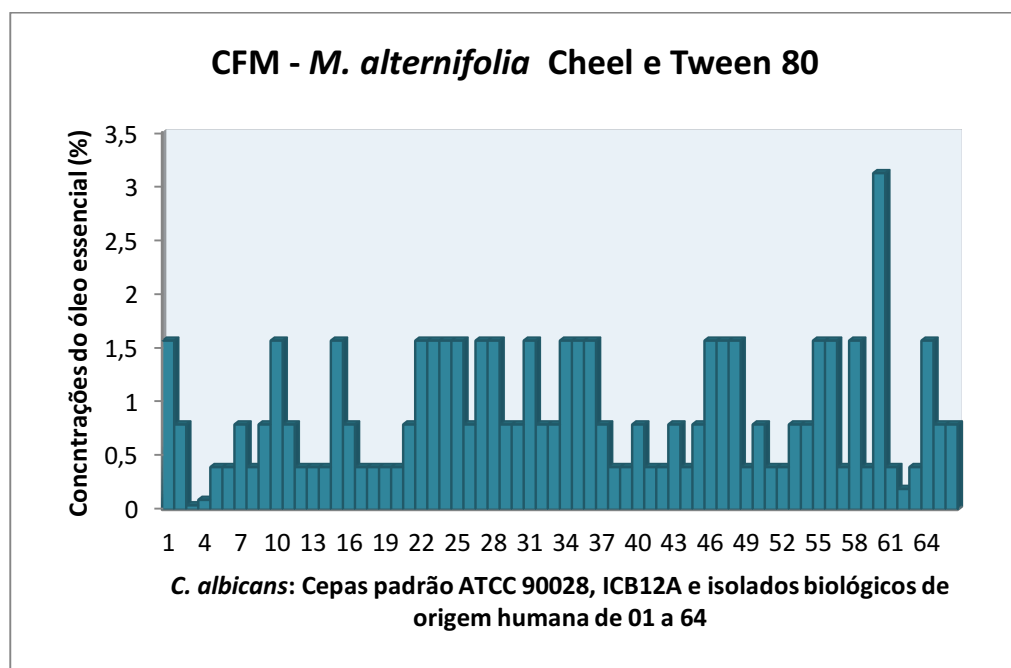


Gráfico 6 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do tensoativos Tween 80 sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

Tabela 23 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 80 (**polissorbato 80**).

Cepas Padrão Isolados	Tween 80		Proteinase*** CONTROLE	Proteinase Tween 80	Fosfolipase CONTROLE	Fosfolipase Tween 80	Morfotipos	Morfotipos
	CIM* µg/mL	CFM** µg/mL	PZ	PZ	PZ	PZ	Controle	Tween 80
ATCC 90028	156,25	1250	0,46	1,00	0,58	0,56	7334	5341
ICB 12a	156,25	625	0,36	1,00	0,60	1,00	7525	7516
1	4,882	39,06	1,00	1,00	0,53	0,89	7325	5531
2	4,88	78,12	1,00	1,00	1,00	1,00	7534	5341
3	312,5	312,5	0,59	1,00	0,38	0,80	1236	7515
4	156,25	312,5	0,36	1,00	0,67	1,00	5345	5344
5	39,06	78,12	0,44	1,00	0,33	1,00	2245	7518
6	156,25	9	0,50	1,00	0,54	0,53	7528	5441
7	156,25	625	0,47	1,00	1,00	1,00	2338	5341
8	156,25	1250	0,32	1,00	0,43	0,42	3325	5331
9	156,25	625	0,40	1,00	0,44	1,00	7325	5521
10	156,25	312,5	0,30	1,00	0,27	0,53	7538	5531
11	156,25	312,5	0,30	1,00	0,36	1,00	3325	0000
12	312,5	312,5	0,45	1,00	0,50	0,67	1241	0001
13	312,5	1250	1,00	1,00	1,00	0,67	7342	1240
14	156,25	625	0,38	1,00	1,00	1,00	3344	1231
15	156,25	312,5	0,44	1,00	0,64	1,00	1320	7326
16	156,25	312,5	0,24	0,71	1,00	1,00	2330	5240
17	78,12	312,5	0,26	1,00	1,00	1,00	2335	7341
18	156,25	312,5	0,35	1,00	1,00	1,00	7541	7531
19	312,5	625	0,35	1,00	0,50	0,80	3235	1241
20	312,5	1250	0,38	1,00	0,56	0,70	7240	5541
21	312,5	1250	0,45	1,00	0,36	1,00	7516	5341
22	625	1250	0,31	1,00	0,43	0,75	1240	1241
23	312,5	312,5	0,33	1,00	0,45	0,82	7328	5341
24	625	625	0,50	1,00	0,43	1,00	5245	5342
25	625	1250	0,29	1,00	0,43	0,78	7334	1344
26	625	1250	0,38	1,00	0,50	0,64	5345	7542
27	312,5	625	0,27	1,00	1,00	0,75	7240	0002
28	156,25	625	0,18	1,00	1,00	1,00	1230	0002

29	625	1250	0,30	1,00	0,50	0,86	7320	5331
30	312,5	625	0,33	1,00	0,67	1,00	0001	7544
31	312,5	625	0,40	1,00	0,46	1,00	5242	0001
32	156,25	1250	0,28	1,00	0,40	1,00	0004	1241
33	1250	1250	0,27	1,00	0,55	1,00	1232	1241
34	312,5	625	0,35	1,00	0,45	1,00	2232	2241
35	156,25	625	1,00	1,00	0,54	1,00	5232	2241
36	19,53	312,5	0,43	1,00	0,38	0,64	5232	5341
37	78,12	312,5	0,27	1,00	0,60	0,71	7544	7240
38	156,25	625	1,00	1,00	0,50	0,78	1240	0001
39	156,25	312,5	0,36	1,00	0,70	0,78	7520	2242
40	156,25	312,5	0,29	0,92	0,42	0,73	7344	0000
41	156,25	625	0,27	1,00	0,55	1,00	7541	0000
42	312,5	312,5	0,33	1,00	0,43	0,87	3342	0000
43	156,25	625	1,00	1,00	0,46	1,00	7344	0000
44	156,25	1250	0,46	1,00	0,50	0,85	7242	0001
45	625	625	1,00	1,00	0,43	1,00	3342	0000
46	156,25	1250	0,38	1,00	0,56	1,00	7542	7341
47	156,25	312,5	0,57	1,00	0,40	1,00	7340	5241
48	312,5	625	0,33	1,00	0,60	0,88	7240	0001
49	156,25	312,5	0,22	1,00	0,50	0,75	7541	0000
50	156,25	312,5	0,25	1,00	0,55	1,00	5341	0000
51	625	625	0,50	1,00	1,00	1,00	7528	1241
52	625	625	0,40	1,00	0,50	0,67	1241	7542
53	1250	1250	0,38	1,00	0,46	1,00	7341	7342
54	1250	1250	0,25	1,00	0,67	1,00	7341	7541
55	156,25	312,5	0,30	1,00	0,46	0,90	7236	0000
56	156,25	1250	0,42	1,00	0,45	1,00	7338	0000
57	156,25	312,5	0,31	1,00	0,69	0,82	7345	1240
58	1250	2500	0,29	1,00	0,50	0,60	1246	7344
59	156,25	312,5	0,27	1,00	0,46	0,63	7344	5340
60	156,25	156,25	0,37	1,00	0,58	0,71	7341	7515
61	156,25	312,5	0,35	1,00	0,55	1,00	5341	5340
62	625	1250	1,00	1,00	0,57	1,00	7538	1241
63	625	625	0,40	1,00	0,50	1,00	7341	7524
64	156,25	625	0,64	1,00	0,80	1,00	7334	1241

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL
 Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM)

*CIM: concentração inibitória mínima

**CFM: concentração fungicida mínima

***Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz ≥ 0,64 = Atividade enzimática positiva

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 24 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel - controle

Variável - isolados biológicos de origem humana	Proteinase	Fosfolipase
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp^{**}$	0,44* \pm 0,22	0,58 \pm 0,20
Mediana	0,37	0,5
Min. – Max.	1- 0,18	1-0,27

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 25 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do tensoativo Tween 80 (polissorbato 80).

Variável - isolados biológicos de origem humana	Proteinase com Tween	Fosfolipase Tween 80
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp^{**}$	0,99* \pm 0,03	0,87 \pm 0,16
Mediana	1	1
Min. – Max.	0,71 – 1	0,42 – 0,42

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

4.9 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.

Não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia* conforme mostra a Tabela 13. Nesta pode-se observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), a CIM e CFM variaram respectivamente de 0,04 a 6,25% (39,06 a 5000 µg/mL) e 0,19 a 25% (156,25 a 20000 µg/mL), com média e desvio padrão para CIM e CFM, respectivamente de $1000,36 \pm 1045,30 \mu\text{g/mL}$ e $3537,6 \pm 3695,61 \mu\text{g/mL}$ (Tabelas 14 e 15) (Gráficos 7 e 8).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido) é 625 µg/mL (0,78%) e 2500 µg/mL (3,12%) respectivamente e de CFM 50 e CFM 90 é respectivamente 2500 µg/mL (3,12%) e 5000 µg/mL (6,25%) (Tabela 16).

A produção de proteinase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), em 47 dos 58 isolados altamente produtores e reduziu a produção dessa enzima em 10 isolados e um isolado manteve a produção inalterada. Dos 66 isolados oito não eram produtores dessa enzima e este estado foi mantido em 7 isolados e um passou a produzir após contato com esse óleo essencial na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido) (Tabela 26).

A produção de fosfolipase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), em 32 isolados altamente produtores, reduziu a produção dessa enzima em 24 isolados. Dos 10 isolados não produtores 2 isolados passaram a produzir esta enzima após contato com o óleo essencial, na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido) (Tabela 26).

A média de produção de proteinase para os 66 isolados era de $0,44 \pm 0,22$. Após contato com o óleo na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), a média de produção passou a $0,95 \pm 0,12$. Para a enzima fosfolipase a produção era de $0,58 \pm 0,20$ e após contato com o óleo, na

presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), a média passou para $0,92\pm 0,30$ (Tabelas 27 e 28)

Quanto a produção de filamentos frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), 1 isolado deixou de filamentar, 25 isolados tiveram a filamentação reduzida, 15 tiveram aumento da filamentação, 23 isolados não apresentaram alteração na filamentação e 2 passaram a produzir relação ao controle (Tabela 26).

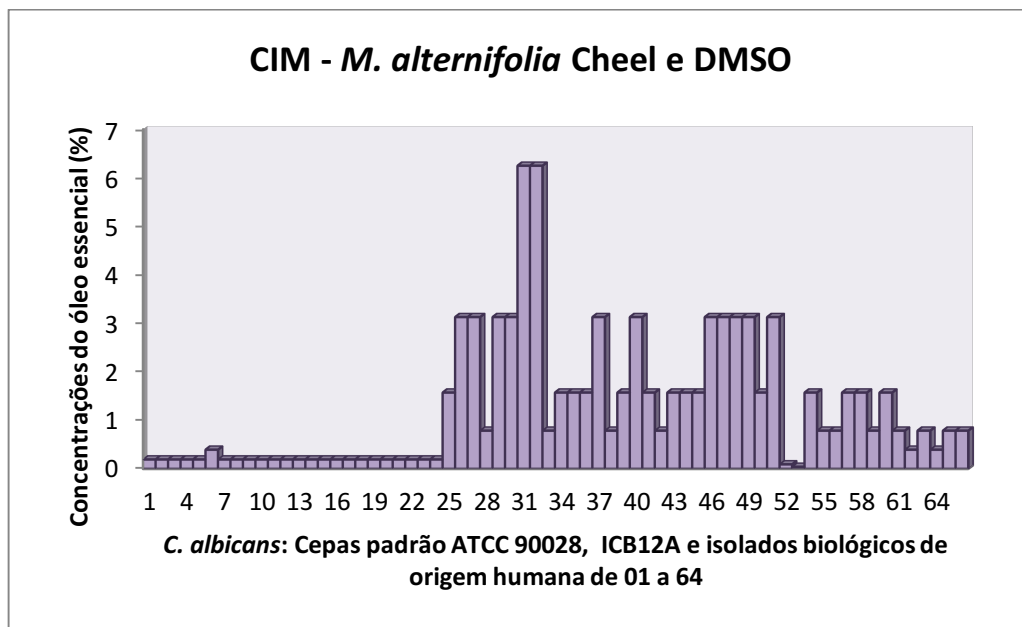


Gráfico 7 Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do solvente DMSO sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

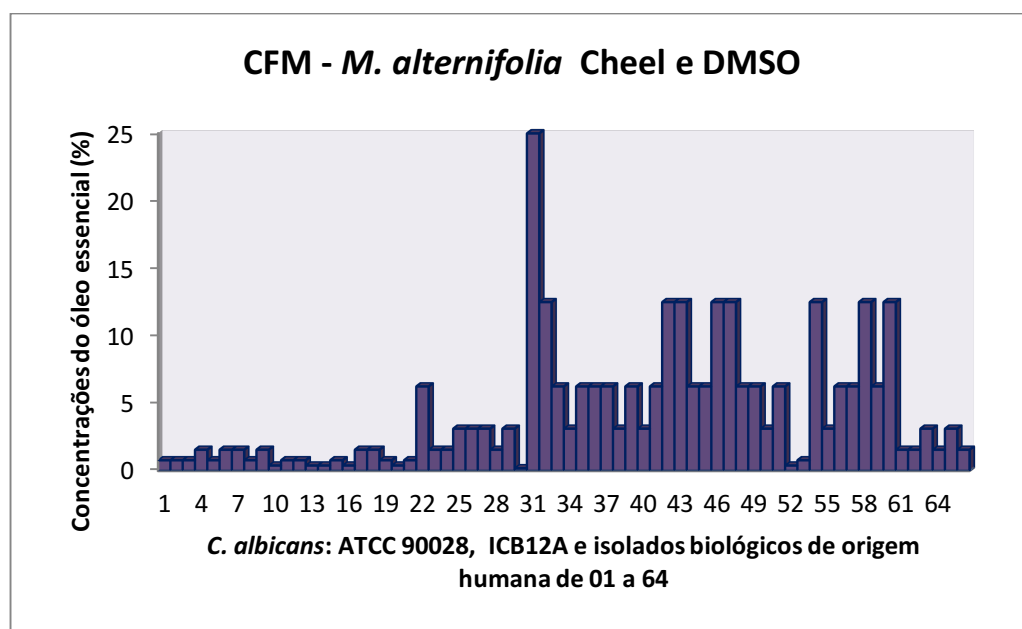


Gráfico 8 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na presença do solvente DMSO sobre *C. albicans*: Cepas padrão ATCC 90028, ICB12A e isolados biológicos de origem humana.

Tabela 26 Atividade enzimática (produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase) e morfotipos dos isolados biológicos e das cepas padrão ATCC 90028 e ICB 12A de *C. albicans* expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido).

Cepas Padrão Isolados	DMSO		Proteinase*** CONTROLE	Proteinase DMSO	Fosfolipase CONTROLE	Fosfolipase DMSO	Morfotipos	Morfotipos	
	Número	CIM* µg/mL	CFM* µg/mL	PZ	PZ	PZ	PZ	Controle	DMSO
ATCC 90028		156,25	625	0,46	1,00	0,58	1,00	7334	3540
ICB 12A		156,25	625	0,36	1,00	0,60	1,00	7525	7541
1		156,25	625	1,00	1,00	0,53	1,00	7325	5241
2		156,25	1250	1,00	1,00	1,00	1,00	7534	5531
3		156,25	625	0,59	1,00	0,38	0,75	1236	5341
4		312,5	1250	0,36	1,00	0,67	1,00	5345	1232
5		156,25	1250	0,44	1,00	0,33	1,00	2245	5341
6		156,25	625	0,50	1,00	0,54	0,63	7528	1241
7		156,25	1250	0,47	1,00	1,00	1,00	2338	7541
8		156,25	312,5	0,32	1,00	0,43	1,00	3325	5541
9		156,25	625	0,40	1,00	0,44	1,00	7325	5541
10		156,25	625	0,30	1,00	0,27	0,75	7538	7531
11		156,25	312,5	0,30	1,00	0,36	0,57	3325	7345
12		156,25	2500	0,45	1,00	0,50	0,67	1241	2241
13		156,25	625	1,00	1,00	1,00	1,00	7342	5541
14		156,25	312,5	0,38	1,00	1,00	1,00	3344	7531
15		156,25	1250	0,44	1,00	0,64	0,86	1320	7531
16		156,25	1250	0,24	0,60	1,00	0,73	2330	7541
17		156,25	625	0,26	1,00	1,00	1,00	2335	5541
18		156,25	312,5	0,35	1,00	1,00	0,75	7541	5541
19		156,25	625	0,35	1,00	0,50	1,00	3235	5541
20		156,25	5000	0,38	1,00	0,56	1,00	7240	1341
21		156,25	1250	0,45	1,00	0,36	1,00	7516	5341
22		156,25	1250	0,31	0,70	0,43	1,00	1240	3340
23		1250	2500	0,33	1,00	0,45	1,00	7328	5344
24		2500	5000	0,50	0,75	0,43	0,73	5245	5340
25		2500	5000	0,29	1,00	0,43	1,00	7334	1240
26		625	1250	0,38	1,00	0,50	1,00	5345	7540
27		2500	5000	0,27	1,00	1,00	1,00	7240	3241
28		312,5	156,25	0,18	1,00	1,00	1,00	1230	1240
29		5000	20000	0,30	1,00	0,50	1,00	7320	7534
30		5000	10000	0,33	1,00	0,67	1,00	0001	7530
31		625	5000	0,40	1,00	0,46	1,00	5242	0000
32		1250	2500	0,28	1,00	0,40	0,70	0004	5340

33	1250	5000	0,27	1,00	0,55	0,71	1232	1240
34	1250	5000	0,35	1,00	0,45	0,80	2232	1240
35	2500	5000	1,00	1,00	0,54	0,57	5232	2241
36	625	2500	0,43	1,00	0,38	1,00	5232	3241
37	1250	5000	0,27	1,00	0,60	1,00	7544	5344
38	2500	2500	1,00	1,00	0,50	1,00	1240	1241
39	1250	5000	0,36	0,71	0,70	1,00	7520	3340
40	625	10000	0,29	0,86	0,42	1,00	7344	7340
41	1250	10000	0,27	0,83	0,55	1,00	7541	5541
42	1250	5000	0,33	1,00	0,43	0,67	3342	7530
43	1250	5000	1,00	1,00	0,46	0,71	7344	7540
44	2500	10000	0,46	1,00	0,50	1,00	7242	3340
45	2500	10000	1,00	0,78	0,43	0,73	3342	5344
46	2500	5000	0,38	0,70	0,56	1,00	7542	7540
47	2500	5000	0,57	1,00	0,40	0,80	7340	7531
48	1250	2500	0,33	1,00	0,60	0,82	7240	3341
49	2500	5000	0,22	1,00	0,50	1,00	7541	7541
50	78,12	312,5	0,25	1,00	0,55	1,00	5341	5341
51	78,12	625	0,50	1,00	1,00	1,00	7528	5535
52	1250	10000	0,40	1,00	0,50	0,83	1241	1240
53	625	2500	0,38	1,00	0,46	1,00	7341	7541
54	625	5000	0,25	0,60	0,67	1,00	7341	7541
55	1250	5000	0,30	1,00	0,46	0,82	7236	2244
56	1250	10000	0,42	1,00	0,45	0,69	7338	7540
57	625	5000	0,31	0,67	0,69	1,00	7345	7542
58	1250	10000	0,29	1,00	0,50	0,64	1246	1341
59	625	1250	0,27	1,00	0,46	0,65	7344	5541
60	312,5	1250	0,37	1,00	0,58	0,59	7341	7541
61	625	2500	0,35	1,00	0,55	1,00	5341	5541
62	312,5	1250	1,00	1,00	0,57	1,00	7538	5541
63	625	2500	0,40	0,67	0,50	0,80	7341	5541
64	625	1250	0,64	0,64	0,80	0,63	7334	5541

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL
 Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM)

*CIM: concentração inibitória mínima

**CFM: concentração fungicida mínima

***Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática

1,0 < Pz ≥ 0,64 = Atividade enzimática positiva

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela. 27 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A na ausência do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel - controle

Variável - isolados biológicos de origem humana	Proteinase	Fosfolipase
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp$	0,44* \pm 0,22	0,58 \pm 0,20
Mediana	0,37	0,5
Min. – Max.	0,18 – 1	0,27 – 1

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela. 28 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase de isolados de amostras biológica e cepas padrão de *C. albicans* ATCC 90028, ICB 12A expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na dose subinibitória e na presença na presença do solvente DMSO (dimetilsulfóxido)

Variável – isolados biológicos de origem humana	Proteinase* com DMSO	Fosfolipase com DMSO
<i>C. albicans</i>	N=66	N=66
$\mu \pm dp$	0,95** \pm 0,12	0,92 \pm 0,30
Mediana	1	1
Min. – Max.	0,60 – 1	0,57 – 3

* Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

4.10 Atividade “in vitro” do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, sobre *C. albicans* no interior do canal radicular

No quadro 2 podemos observar o Comprimento Real do(s) Dente(s) (CRD) utilizados para o ensaio “in vitro” da atividade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, sobre *C. albicans*.

Quadro 2 – Relação dos tipos de dentes e Comprimento real do dente (CRD) utilizados no ensaio “in vitro” do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, sobre *C. albicans* no interior do canal radicular

Número do Dente	Tipo de dente	Número do Dente	Tipo de dente
1	Incisivo lateral superior	31	Incisivo Central superior
2	Pré molar inferior	32	Incisivo lateral superior
3	Canino Inferior	33	Incisivo Central superior
4	Incisivo Central superior	34	incisivo lateral inferior
5	Canino Superior	35	Incisivo lateral superior
6	Canino Inferior	36	Incisivo Central superior
7	Incisivo Central superior	37	Incisivo lateral superior
8	Incisivo lateral superior	38	Incisivo lateral superior
9	Incisivo lateral superior	39	Incisivo lateral superior
10	Incisivo central inferior	40	Canino Inferior
11	Incisivo lateral superior	41	Incisivo Central superior
12	Incisivo lateral superior	42	Incisivo Central superior
13	Incisivo central inferior	43	Incisivo lateral superior
14	Canino superior	44	Incisivo Central superior
15	Canino inferior	45	Incisivo Central superior
16	Pre molar inferior	46	Incisivo lateral superior
17	Incisivo lateral superior	47	Pre molar inferior
18	Incisivo Central superior	48	Pre molar inferior
19	Incisivo lateral superior	49	Incisivo Central superior
20	Incisivo lateral superior	50	Canino Superior
21	Incisivo lateral superior	51	Canino Inferior
22	Incisivo lateral superior	52	Pre molar inferior
23	Pré molar inferior	53	Canino Superior

24	Canino Superior	54	Canino Superior
25	Incisivo Central supe	55	Canino Superior
26	Canino Superior	56	Pre molar inferior
27	Incisivo Central supe	57	Pre molar inferior
28	Incisivo Central supe	58	Canino Superior
29	Canino Superior	59	Incisivo lateral super
30	Pre molar inferior	60	Incisivo Central super

*Comprimento real do dente (CRD) em milímetro (mm) - O comprimento foi determinado pela introdução de lima tipo K de fino calibre com limitador de silicone até que sua guia de penetração alcance o forame apical. Foi subtraído 1 mm desse valor, aferido com régua milimetrada.

Para a avaliação da atividade “in vitro” do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, sobre *C. albicans* no interior do canal radicular, os 60 dentes foram divididos em 12 grupos com 5 dentes cada. Após o experimento foi retirado o conteúdo de cada canal radicular com cone de papel e este semeado em placas contendo Ágar Sabouraud-glicose incubada por 24 horas a 37°C. Após este período observou-se a ausência ou a presença de crescimento de colônias de *C.albicans*, obtendo-se os seguintes resultados:

Grupo I (dentes 1 a 5)

Foi colocado apenas o meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) – controle negativo do meio de cultura e após 24 horas, acrescido do meio RPMI 1640 - todas as culturas foram negativas.

Grupo II (dentes 5 a 10)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 - controle positivo e após 24 horas, acrescido do meio RPMI 1640 - todas as culturas foram positivas para levedura (Tabela 29).

Grupo III (dentes 10 a 15)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 100% (80.000µg/mL) - todas as culturas foram negativas.

Grupo IV (dentes 15 a 20)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP) – Controle: todas as culturas foram negativas.

Grupo V (dentes 20 a 25)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10% (8.000µg/mL) - todas as culturas foram negativas.

Grupo VI (dentes 25 a 30)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 0,78% (625µg/mL) (CFM)n – Um dente apresentou cultura positiva para levedura (Tabela 29).

Grupo VII (dentes 30 a 35)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 2 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10% (8.000µg/mL) - todas as culturas foram negativas.

Grupo VIII (dentes 35 a 40)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 2 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 0,39% (312,5µg/mL) (CFM) - todas as culturas foram negativas.

Grupo IX (dentes 40 a 45)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 23 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10%(8.000µg/mL). - todas as culturas foram negativas.

Grupo X (dentes 45 a 50)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 23 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 0,09% (78,12µg/mL) (CFM). Dois dentes apresentaram cultura positiva para levedura (Tabela 29).

Grupo XI (dentes 50 a 55)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 56 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 10% (8.000µg/mL). – Um dente apresentou cultura positiva para levedura (Tabela 29).

Grupo XII (dentes 55 a 60)

Foi colocada uma suspensão de *C. albicans* amostra 56 preparada conforme item 3.6 e após 24 horas, acrescido de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na concentração a 1,56% (1.250µg/mL) (CFM) - Dois dentes apresentaram cultura positiva para levedura (Tabela 29).

Na tabela 29 observa-se que os isolados de *C. albicans* 23 e 56 altamente produtores de proteinase e fosfolipase cresceram em dois dos 5 dentes avaliados nas concentrações fungicidas mínimas do óleo essencial de *M. alternifolia* CFM 0,09% (78,12 µg/mL) e CFM 1,56% (1250 µg/mL) respectivamente.

Tabela 29 Atividade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel na Concentração Fúngica Mínima (CFM) e a 10% (8.000µg/mL) sobre amostra padrão e isolados de *Candida albicans* com diferentes atividades enzimáticas no interior do conduto dentinário “in vitro”.

Grupo (G)	Atividade Enzimática		Atividade do PRP e do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	
	Proteinase	FFosfolipasε	Crescimento	Ausência de crescimento
Amostras/isolados de <i>C. albicans</i> na presença de PRP ⁱ do óleo essencial de <i>M.alternifolia</i> na CFM** e a 10%				
(G1) Controle do meio de cultura RPMI 1640	-	-	-	5/5
(G2) Controle da amostra de <i>C.albicans</i> ATCC 90028	0,46	0,58	5/5	-
(G3) <i>C.albicans</i> ATCC 90028 + <i>M. alternifolia</i>	0,46	0,58	-	5/5
(G4) <i>C.albicans</i> ATCC 90028 + PRP	0,46	0,58	-	5/5
(G5) <i>C.albicans</i> ATCC 90028 + <i>M. alternifolia</i> 10%	0,46	0,58	-	5/5
(G6) <i>C.albicans</i> ATCC 90028+ <i>M. alternifolia</i> 0,78%	0,46	0,58	1/5	4/5
(G7) <i>C. albicans</i> 2 + <i>M. alternifolia</i> 10%	1,00	1,00	-	5/5
(G8) <i>C. albicans</i> 2 + <i>M. alternifolia</i> CFM 0,39%	1,00	1,00	-	5/5
(G9) <i>C. albicans</i> 23 + <i>M. alternifolia</i> 10%	0,33	0,45	-	5/5
(G10) <i>C. albicans</i> 23 + <i>M. alternifolia</i> CFM 0,09%	0,33	0,45	2/5	3/5
(G11) <i>C. albicans</i> 56 + <i>M. alternifolia</i> 10%	0,42	0,45	1/5	4/5
(G12) <i>C. albicans</i> 56 + <i>M. alternifolia</i> CFM 1,56%	0,42	0,45	2/5	3/5

*PRP - Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro®

**CFM - Concentração Fúngica Mínima

***Atividade Enzimática: Pz=1,0= Não Produtora. = Índice 1

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Produtoras.= índice 2

Pz < 0,64 = fortemente produtora = índice 3

4.11 Atividade *in vivo* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, no interior do canal radicular

Foram estudados 20 pacientes de ambos os sexos com diagnóstico de necrose pulpar sendo 10 tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP) PRP (Grupo 1 - Controle) e 10 tratados com óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 a 0,02% (Grupo 2). Foi realizado um relatório de cada paciente e a cada atendimento (Anexo 9).

A opção do tratamento do canal radicular *in vivo* com a concentração de *M. alternifolia* Cheel, 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 á 0,02% foi feita com base na observação dos resultados apresentados na tabela 13, 14 e na tabela 29 onde a maior concentração utilizada foi 8.000µg/mL (10%) no teste *in vitro* e mesmo assim ocorreu o isolamento de uma amostra de *C. albicans*. Para o teste *in vivo*, com o objetivo de não se correr riscos dobramos essa concentração.

Grupo 1 - Pacientes tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP) – Grupo Controle

Dos 10 pacientes tratados com PRP 60% (6/10) eram do sexo feminino e 40% (4/10) eram do sexo masculino, com idade média de 39,3 anos.

Neste grupo foram tratados 8 dentes posteriores e dois dentes anteriores, sendo que 80% (8/10) tiveram como causa da necrose pulpar a cárie, 10% (1/10) tiveram como causa da necrose pulpar o trauma oclusal e 10% (1/10) o uso prolongado de coroa protética. O diagnóstico de polpa morta foi realizado por exames clínicos e radiográficos (Quadro 3).

Quadro 3 Pacientes do grupo controle, tipos de dentes, presença de sinais e sintomas antes e após o tratamento endodôntico com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP) identificado por meio de exames subjetivos, objetivos e radiológicos e levedura isolada.

Paciente número	Sexo	Tipo de dente*	Sinais e sintomas antes da intervenção				Sinais e sintomas Após a intervenção		Levedura
			Dor espontânea	Edema	Lesão periapical	Cárie	Dor	Gosto Ruim	
01 PRP*	F***	2PMS	Ausente	Ausente	Presente	Presente	1 dia	Ausente	Negativo
02 PRP	F	1MID	Ausente	Ausente	Presente	Presente	1 dia	Ausente	Negativo
03 PRP	F	1MID	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente		Negativo
04 PRP	M***	1PMII	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	2 dia	Ausente	Negativo
05 PRP	F	2PMS	Ausente	Ausente	Presente	Presente	2 dia	Ausente	Negativo
06 PRP	F	2PMS	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1 dia	Ausente	<i>C.albicans</i>
07 PRP	F	ILSE	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Negativo
08 PRP	M	1MIE	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente		Negativo
09 PRP	M	ILSE	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente		Negativo
10 PRP	M	1MSE	Presente	Presente	Ausente	Presente	1 dia	Ausente	Negativo

*O tipo de dente está relatado na descrição dos casos clínicos dos pacientes tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP)

** PRP - Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400

F – Feminino e *M - Masculino

Os dentes diagnosticados com polpa morta foram tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP). As amostras para o isolamento de leveduras foram coletadas logo após acesso a câmara pulpar com cone de papel estéril e semeados em Agar Sabouraud – dextrose com 200µg de cloranfenicol, para a pesquisa de leveduras.

C. albicans foi isolada em 10% (1/10) dos pacientes, apenas na primeira coleta (Quadro 3). Em nenhum paciente foi encontrado levedura na segunda coleta. Para 20% (2/10) dos pacientes foi prescrito Amoxicilina 500 mg entre as sessões por 7 dias após a primeira intervenção Gosto desagradável foi relatado em 10% (1/10) dos pacientes entre se sessões e 40% (4/10) relataram dor por um dia após a primeira intervenção e 20% (2/10) relataram dor por dois dias após a intervenção.

Grupo 1: Descrição dos casos clínicos dos pacientes tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP)

Paciente 1 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 55 anos. Dente: segundo pré molar superior esquerdo com lesão extensa de cárie. Diagnóstico: polpa morta.

O exame radiográfico mostrou lesão periapical e o tratamento endodôntico foi realizado com PRP como medicação intracanal. A paciente relatou dor por um dia após intervenção. O canal foi obturado após 6 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 2 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 36 anos. Dente: primeiro molar inferior direito com lesão extensa de cárie e lesão periapical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP como medicação intracanal. A paciente não relatou dor após a intervenção. O canal foi obturado após 7 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 3 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 33 anos. Dente: primeiro molar inferior direito lesão profunda de cárie com restauração provisória de óxido de zinco eugenol (OZE) apresentava dor a percussão vertical e relatou ter tomado via sistêmica, antibiótico e antiinflamatório, anterior ao atendimento.

Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP como medicação intracanal. Canal obturado após 10 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 4 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 53 anos. Dente: primeiro pré molar inferior direito com lesão extensa de cárie. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP. O paciente relatou a região dolorida por dois dias após a intervenção. Canal obturado após 8 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 5 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 34 anos. Dente: segundo pré molar superior esquerdo com lesão de cárie, lesão periapical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP. O paciente relatou dor aguda na região por 2 dias após a primeira intervenção e tomou analgésico por 3 dias. Canal obturado após 17 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 6 - PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 42 anos. Dente: segundo pré molar superior esquerdo com grande restauração metálica próximo a câmara pulpar. Teste de vitalidade negativo com dor a percussão vertical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP. Canal obturado após 9 dias de tratamento.

Foi isolada *C. albicans* na primeira coleta. A segunda coleta no canal foi negativa.

Paciente 7 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 38 anos. Dente: incisivo lateral superior esquerdo, com lesão peripical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP. O paciente relatou gosto ruim e ardência na língua. Canal obturado após 13 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 8 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 19 anos. Dente: primeiro molar inferior esquerdo com cárie e lesão periapical. Diagnóstico: polpa morta e abscesso periapical.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP como medicação intracanal, durante a instrumentação a secreção purulenta foi drenada. O

paciente foi medicado com Amoxicilina 500 mg. O canal foi obturado após 21 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 9 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 54 anos. Dente: Incisivo lateral superior esquerdo com edema na região e dor espontânea. O paciente relatou ter tomado analgésico antes da intervenção. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP como medicação intracanal. O canal foi obturado após 7 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 10 – PRP

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 29 anos. Dente: primeiro molar superior esquerdo. Apresentava dor espontânea. Ao exame radiográfico observou-se cárie. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com PRP como medicação intracanal. Forte odor desagradável foi observado ao acessar a câmara pulpar. O canal foi obturado após 11 dias de tratamento e o paciente apresentou dor por 1 dia após a primeira intervenção e foi medicado com analgésico. Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Grupo 2 - Pacientes tratados com óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v com Tween 20 a 0,02%.

Dos 10 pacientes tratados com óleo essencial de *M. alternifolia* 70% (7/10) eram do sexo masculino e 30% (3/10) eram do sexo feminino com idade média de 37,7 anos.

Neste grupo foram tratados 9 dentes posteriores e um dente anterior, sendo que 80% (8/10) tiveram como causa da necrose pulpar a cárie, 10% (1/10) tiveram como causa da necrose trauma e 10% (1/10) necrose idiopática. O diagnóstico de polpa morta foi realizado por exames clínicos e radiográficos (Quadro 4).

Quanto aos sinais e sintomas, neste grupo, a coleção purulenta foi observada em 30% (3/10) dos pacientes bem como a dor (Quadro 4) No exame radiográfico inicial observamos lesão periapical em 50% (5/10) dos pacientes e edema em 40% (4/10). Quatro pacientes (1, 4, 7 e 9) relataram ter tomado medicação (analgésico) antes da intervenção para minimizar a dor, sendo que um deles (paciente 1) tomou analgésico associado a antiinflamatório.

Os dentes diagnosticados com polpa morta foram tratados com óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 a 0,02%. As amostras para o isolamento de leveduras foram coletadas logo após acesso a câmara pulpar com cone de papel estéril e semeados em Agar Sabouraud – dextrose com 200µg de cloranfenicol, para a pesquisa de leveduras.

C. albicans foi isolada em 40% (4/10) dos pacientes e *Candida* sp, em 10% (1/10) pacientes e apenas na primeira coleta (Quadro 4). Em nenhum paciente foi encontrado levedura na segunda coleta. Para 40% (4/10) dos pacientes foi prescrito Amoxicilina 500 mg e Metronidazol associados ou separados dependendo dos casos e entre as sessões por 7 dias após a primeira intervenção (Quadro 4). Gosto desagradável foi relatado em 10% (1/10) dos pacientes entre sessões (paciente 10) e 10% (1/10) relataram dor por um dia após a primeira intervenção (paciente 5).

Quadro 4 Pacientes do grupo experimental, tipos de dentes, presença de sinais e sintomas antes e após o tratamento endodôntico com óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v com Tween 20 a 0,02% identificado por meio de exames subjetivos, objetivos e radiológicos e levedura isolada.

Paciente número	Sexo	Tipo de dente	Presença de sinais e sintomas Antes da intervenção				Medicação após a intervenção	Leveduras
			Dor espontânea	Edema	Lesão periapical	Cárie		
01 Ma**	M***	1PMIE	ausente	presente	ausente	presente		Negativo
02 Ma	M	1MID	ausente	ausente	presente	presente	Metronidazol	<i>C. albicans</i>
03 Ma	M	1CSE	ausente	ausente	ausente	ausente	Metronidazol Amoxicilina	Negativo
04 Ma	F***	2PMID	ausente	ausente	presente	presente	-	<i>Candida sp</i>
05 Ma	M	2PMID	presente	presente	presente	presente	-	<i>C. albicans</i>
06 Ma	F	2PMSI	ausente	ausente	presente	presente	-	<i>C. albicans</i>
07 Ma	M	2MIE	ausente	ausente	ausente	presente	-	Negativo
08 Ma	M	1MID	presente	presente	ausente	presente	Metronidazol Amoxicilina	<i>C. albicans</i>
09 Ma	M	2PMSI	ausente	presente	ausente	presente	Amoxicilina	Negativo
10 Ma	F	2PMSD	presente	ausente	presente	ausente	-	Negativo

*O tipo de dente está relatado na descrição dos casos clínicos dos pacientes tratados com óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v com Tween 20 a 0,02%.

** Ma - óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v com Tween 20 a 0,02%.

F – Feminino e *M - Masculino

Grupo 2: Descrição dos casos clínicos dos pacientes tratados com o óleo essencial de *M.alternifolia* à 20% v/v com Tween 20 a 0,02%

Paciente 1 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 48 anos. Dente primeiro pré molar inferior esquerdo. Presença de edema na região periapical apresentando lesão de cárie na região distal do elemento. Diagnóstico: polpa morta.

O exame radiográfico não mostrou lesão periapical e o tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia* como medicação intracanal. Paciente não relatou ocorrências após a intervenção. O canal foi obturado após 8 dias de tratamento. Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 2 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 56 anos. Dente: primeiro molar inferior direito. O paciente relata dor a percussão vertical e ter tomado antibiótico e anti-inflamatório anteriormente. Lesão endoperiodontal com comprometimento de furca e lesão periapical difusa. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia* como medicação intracanal. O paciente foi medicado com Metronidazol 400 mg por 5 dias. O mesmo não relatou ocorrências após a intervenção. O canal foi obturado após 16 dias de tratamento.

Foi isolada *C. albicans* na primeira coleta. A segunda coleta no canal foi negativa.

Paciente 3 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 25 anos. Dente: incisivo central superior esquerdo. O paciente relata trauma na região há 3 anos e apresentava dor a percussão vertical. O teste de vitalidade foi negativo. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia*. Durante a primeira sessão drenou coleção purulenta e foi medicado com Amoxicilina 500mg associada ao Metronidazol 400 mg por 7 dias. O canal foi obturado após 13 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 4 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 34 anos. Dente: segundo pré molar inferior direito com lesão extensa de cárie e lesão periapical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia*. O canal foi obturado após 7 dias de tratamento.

Foi isolada *Candida sp* na primeira coleta. A segunda coleta no canal foi negativa.

Paciente 5 - Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 43 anos. Dente: segundo pré molar inferior direito. Paciente com dor espontânea na região, lesão extensa de cárie e lesão periapical. O mesmo relatou ter tomado analgésico antes da primeira intervenção. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia*. O paciente relatou dor na região por 1 dia após a primeira intervenção. O canal foi obturado após 9 dias de tratamento.

Foi isolada *C. albicans* na primeira coleta. A segunda coleta no canal. foi negativa

Paciente 6 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo feminino, 63 anos. Dente: segundo pré molar superior esquerdo com lesão de cárie e lesão periapical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia*. O canal foi obturado após 7 dias de tratamento.

Foi isolada *C. albicans* na primeira coleta. A segunda coleta no canal foi negativa

Paciente 7 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 34 anos, Dente: segundo molar inferior esquerdo, com lesão extensa de cárie. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia*. O canal foi obturado após 9 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 8 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 19 anos. Dente: primeiro molar inferior direito. Paciente com edema na região, dor espontânea e dor a percussão vertical. Relatou ter tomado analgésico. Diagnóstico: polpa morta e abscesso periapical.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia* como medicação intracanal. Durante a instrumentação se drenou abundante secreção purulenta. O paciente foi medicado com Amoxicilina 500 mg e Metronidazol 400 mg por 7 dias e relatou regressão dos sintomas após a intervenção. O canal foi obturado após 16 dias de tratamento.

Foi isolada *C. albicans* na primeira coleta. A segunda coleta no canal foi negativa.

Paciente 9 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo masculino, 29 anos, Dente: segundo pré molar superior esquerdo Paciente com edema na região, relatou dor ao morder, Diagnóstico polpa morta e início de abscesso periapical.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia* como medicação intracanal. Durante a instrumentação observou-se forte odor desagradável. O paciente foi medicado com Amoxicilina 500 mg por 5 dias. O canal foi obturado após 8 dias de tratamento.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

Paciente 10 – Óleo essencial de *M. alternifolia*

Descrição do caso clínico:

Paciente do sexo Feminino, 26 anos. Dente: segundo pré molar superior direito. Paciente com dor espontânea relatou ter tomado analgésico. Ao exame radiográfico observou-se lesão periapical. Diagnóstico: polpa morta.

O tratamento endodôntico foi realizado com o óleo essencial de *M. alternifolia* como medicação intracanal.

O canal foi obturado após 8 dias de tratamento e o paciente relatou gosto desagradável na boca no primeiro dia após a intervenção.

Não foi isolada levedura das coletas no canal.

4.12 Características morfológicas das leveduras isoladas dos canais radiculares dos grupos 1 e 2.

Das 6 leveduras isoladas dos canais radiculares, uma foi de paciente do grupo 1 e identificada como *C.albicans* e cinco de pacientes do grupo 2. Sendo quatro identificadas como *C.albicans* e uma como *Candida* não albicans, *Candida ssp* (Tabela 30)

A tabela 30 mostra os pacientes, sexo, patologia e as características morfológicas das leveduras isoladas.

Tabela 30 Pacientes, sexo, patologia e características morfológicas das leveduras isoladas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos 1 e 2.

Número de Paciente/ Grupo	Sexo	Patologia	Levedura	Produção de Enzimas(PZ)		Morfortipos**
				Proteinase	Fosfolipase	
6 PRP***	F	Polpa morta	<i>C. albicans</i>	0,62	1,00	7544
2 Ma****	M	Lesão Endopériodontal	<i>C. albicans</i>	1,00	0,77	3241
4 Ma	F	Lesão periapical	<i>Candida sp</i>	0,63	1,00	5341
5 Ma	M	Lesão periapical	<i>C. albicans</i>	0,50	1,00	2240
6 Ma	F	Lesão periapical	<i>C. albicans</i>	1,00	0,63	7334
8 Ma	M	Abcesso periapical	<i>C. albicans</i>	0,80	0,87	7534

* Índice de Atividade Enzimática (Price et al.,1982)

Pz=1,0= Ausência de atividade enzimática = Índice 1

1,0 < Pz ≥ 0,64 = Atividade enzimática positiva = índice 2

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva = índice 3

** Morfortipos: Condições de cultivo: Teste em meio de ágar malte, incubadas a 25 ° C por 10 dias. Phongpaichit et al., 1987 e Hunter et al., 1989

*** PRP - Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400

**** Ma - óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v com Tween 20 a 0,02%.

4.13 Características morfológicas e de sensibilidade das leveduras isoladas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos 1 e 2 frente ao óleo essencial de *M.alternifolia* Cheel com Tween 20 a 0,02%.

A tabela 31 mostra as características morfológicas e de sensibilidade das leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2 frente ao óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02%. As características morfológicas foram observadas nas doses subinibitórias.

Tabela 31 Características morfológicas e de sensibilidade das leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2 frente ao óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02%.

Número d Paciente, Grupo	Levedura	Sensibilidade***** CFM*****		Produção de Enzimas(PZ)*				Morfortipos**	
				Proteinase		Fosfolipase			
		%	µg/mL	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
6 PRP***	<i>C. albicans</i>	0,78	625	0,62	0,76	1,00	1,00	7544	1240
2 Ma****	<i>C. albicans</i>	3,12	2500	1,00	1,00	0,77	1,00	3241	3240
4 Ma	<i>Candida sp</i>	6,25	5000	0,63	1,00	1,00	1,00	5341	3241
5 Ma	<i>C. albicans</i>	0,39	312,5	0,50	1,00	1,00	1,00	2240	0000
6 Ma	<i>C. albicans</i>	0,19	156,25	1,00	1,00	0,63	1,00	7334	5340
8 Ma	<i>C. albicans</i>	0,78	625	0,80	0,70	0,87	1,00	7534	2341

* Índice de Atividade Enzimática (Price et al.,1982) (Antes do contato com óleo e Depois do contato com o óleo - dose sub inibitória):

Pz=1,0= Ausência de atividade enzimática = Índice 1

Pz ≥ 0,64 = Atividade enzimática positiva = índice 2

0,64 = Atividade fortemente positiva = índice 3

1,0 <

Pz <

** Morfortipos: Phongpaichit *et al.*, 1987 e Hunter *et al.*, 1989

*** PRP - Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400

**** Ma - óleo essencial de *M. alternifolia* 20% v/v com Tween 20 a 0,02%.

*****Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 24 horas: resultado em % e µg/mL com Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM)

*****CFM – Concentração Fungicida Mínima

Não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia* conforme mostra a tabela 31 e gráfico 10. Nesta pode-se observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) a CFM variaram respectivamente de 0,19 a 6,25% (156,25 a 5000 µg/mL), com média e desvio padrão para CFM, de 1536,46 ± 1896,79µg/mL (Tabela 32).

Os valores de CFM 50 e CFM 90 para o óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) é 625 µg/mL (0,78%) e 2500 µg/mL (3,12%) respectivamente (Tabela 34).

A produção de proteinase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) em dois dos 6 isolados altamente produtores e reduziu a produção dessa enzima em um isolado e aumentou em outro. Dois isolados não eram produtores dessa enzima e a ausência de produção se manteve após contato com esse óleo essencial, na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) (Tabela 31).

A produção de fosfolipase foi inibida frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) em três isolados sendo um altamente produtor e dois produtores. Três isolados não eram produtores dessa enzima e a ausência de produção se manteve após contato com esse óleo essencial, na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) (Tabela 31).

A média de produção de proteinase para os 6 isolados era de $0,75 \pm 0,21$. Após contato com o óleo presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) a média de produção passou a $0,91 \pm 0,14$. Para a enzima fosfolipase a produção era de $0,87 \pm 0,15$ e após contato com o óleo presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20) para 1 ± 0 (negativo) (Tabela 33).

Quanto a produção de filamentos frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na presença do tensoativo Tween 20 (polissorbato 20), cinco isolados tiveram a filamentação reduzida e um isolado passou a não produzir filamentação em relação ao controle (Tabela 31).

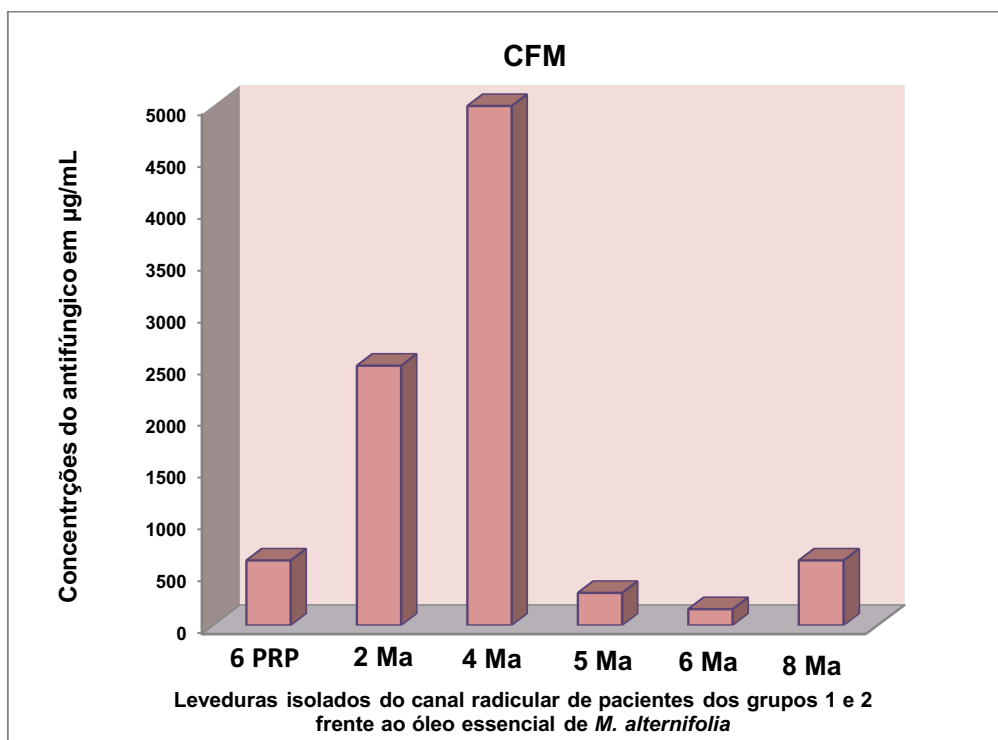


Gráfico 9 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02% frente as leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2

Tabela 32 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da Concentração Fungicida Mínima (CFM) ao óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02% frente as leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2

VARIAVEIS	Sensibilidade ao óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 20 0,02% (µg/mL)*
<i>C. albicans</i> e <i>Candida sp</i>	N=6***
$\mu \pm dp$ ****	1536,46 \pm 1896,79
Mediana	625
Min.-Max.*****	156,25 - 5000

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em µg/mL

** número de amostras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2

**** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

*****Min. – Mínima e Max. Máxima

Tabela 33 Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da produção de proteinase e fosfolipase das leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2 na ausência - Controle e na presença do óleo essencial de *M. alternifolia*, acrescido de Tween 20 a 0,02%.

Variável - isolados biológicos de origem humana	Proteinase		Fosfolipase	
	N=6*		N=6	
<i>C. albicans</i> e <i>Candida sp</i>	Antes	Depois	Antes	Depois
$\mu \pm dp$	0,75 \pm 0,21	0,91 \pm 0,14	0,87 \pm 0,14	1 \pm 0
Mediana	0,71	1	0,93	1
Min. - Max.	0,5 - 1	0,7 - 1	0,63 - 1	1 - 1

* número de amostras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2

** Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática

1,0 < Pz \leq 0,64 = Atividade enzimática positiva

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 34 Valores de CFM 50 e CFM 90 do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, acrescido de Tween 20 na concentração a 0,02% sobre leveduras isoladas do canal radicular dos pacientes dos grupos 1 e 2

Leveduras dos grupos 1 e 2	Concentração Fungicida Mínima	
	CFM 50 $\mu\text{g/mL}$ - % (v/v)	CFM 90 $\mu\text{g/ml}$ - % (v/v)
óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> acrescido de Tween 20 a 0,02%	625 - 0,78	2500 - 3,12

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar

Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: resultado em $\mu\text{g/mL}$

CFM: concentração fungicida mínima

*CFM 50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

**CFM 90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

v/v: volume por volume em porcentagem

Nas condições desse estudo o tratamento do canal radicular *in vivo* com o óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração a 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 á 0,02% foi eficiente já que a levedura com maior CFM foi a *Candida sp* (5.000µg/mL – 6,25%). O isolamento de *C albicans* ocorreu apenas na primeira coleta e após a utilização do óleo essencial de *M. alternifolia* leveduras não foram isoladas nos tratamentos subsequentes.

5. Discussão.

5.1 *Candida albicans*

C.albicans em infecções endodônticas tem recebido atenção especial devido a capacidade dessas leveduras se manterem tanto em infecções primárias quanto refratárias. E apesar de aparecerem em menor número que as bactérias, essas leveduras apresentam mecanismos de adaptação a uma variedade de condições. Os túbulos dentinários podem favorecer a permanência de *C.albicans* no interior de dentes tratados endodonticamente por formarem um microambiente aonde muitas vezes as substâncias químicas auxiliares não chegam e portanto não agem, fazendo assim com que microrganismos com grande capacidade de adaptação sobrevivam e causem infecções secundárias, Entre esses mecanismos pode-se citar: a adesão a superfícies, a produção de exoenzimas hidrolíticas, a transição morfológica, a formação de biofilmes e as formas de defesa ao sistema imune do hospedeiro (Ruff et al., 2006; Moham e Ballai 2008; Gauwerky et al 2009; Chandra et al. 2010 e Lins et al., 2010).

A produção de exoenzimas reflete o grau de patogenicidade de *C. albicans*. A exoenzima proteinase é capaz de degradar vários substratos, entre eles o colágeno dentinário (Waltimo et al., 2004; Chandra et al., 2010). As proteinases se aderem a membrana celular e seu principal papel é suprir nutricionalmente as células fúngicas, colaborar com a penetração e invasão e driblar o sistema imune do hospedeiro (Gawerky et al., 2009).

C.albicans altamente produtoras de proteinase apresentaram resistência a anfotericina B (Kumar e Skula, 2010). Pelo exposto uma observação importante neste estudo está relacionada inibição e redução da produção de proteinase de *C. albicans* quando submetidas a doses subinibitórias do óleo essencial de *M. alternifolia*, na ausência ou presença de tensoativos ou solventes, conseqüentemente reduzindo com isso a capacidade de virulência dessa levedura. Vale ressaltar que neste estudo as concentrações

utilizadas dos tensoativos ou solventes, não apresentavam atividade sobre as leveduras e seus fatores de virulência.

A exoenzima fosfolipase atua na hidrólise dos fosfolipídios dando origem a lisofosfolipídios, que causam dano à célula epitelial. São importantes e participam dos processos de patogenicidade dos microrganismos. A atividade da fosfolipase, como um fator de virulência tem sido estudada não só em fungos, como também em bactérias e protozoários (Ibrahim et al., 1995; Kantarcioglu e Yucel, 2002; Naglik et al., 2003 (a e b) e 2004).

A fosfolipase é uma enzima que degrada fosfolipídeos, presentes em todas as formas de vida e estão freqüentemente associadas às membranas celulares, podendo estar no processo de invasão de *C. albicans* nos tecidos (Martins et al., 2002). A presença da fosfolipase em *C. albicans* é significativa (Kumar e Skula, 2010), mas assim como na proteinase a exposição dessa levedura em doses subinibitórias do óleo essencial de *M. alternifolia*, reduz ou inibe a produção dessa enzima e conseqüentemente também reduz a capacidade de virulência dessa levedura.

Clorexidina é um enxaguatório bucal amplamente utilizado pela população em geral. Num estudo realizado por Calamari e colaboradores em 2011 estes autores observaram que a produção de fosfolipase em isolados de *C. albicans* da saliva de 10 pacientes portadores de candidíase bucal, próteses parciais ou totais, não era alterada quando expostas a clorexidina. Por outro lado o óleo essencial de *M. Alternifolia* vêm da combinação de diferentes compostos. Geralmente é o resultado de um efeito combinado de compostos ativos e inativos. Os compostos inativos podem influenciar a velocidade das reações e biodisponibilidade dos compostos ativos (Oliveira, 2007), tornando dessa forma esse óleo essencial muito mais interessante o seu uso nos enxaguatórios bucais.

A produção de proteinase e fosfolipase por leveduras isoladas de diferentes sítios do corpo humano, vem sendo estudada por vários autores e todos relatam uma produção dessas enzimas em torno de 50% a 90% desses isolados (Pires et al., 1996; Silva, 1999; Silva, 2007, Patel et al., 2009, Costa et

al., 2010). Neste estudo em torno de 82% a 85% dos isolados foram produtores de fosfolipase e proteinase respectivamente.

Nos grupos de pacientes, controle e tratados com o óleo essencial de *M. alternifolia* as leveduras isoladas de lesões primárias de canais radiculares apresentaram produção de proteinase de 66,67% e fosfolipase em 50% dos isolados, dentro dos índices de produção encontrado nos estudos citados.

Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na cavidade bucal de 25% de adultos sadios e em 50% em pacientes hospitalizados. Esta presença é confirmada na placa dental, cárie dental, túbulos dentinários, microbiota subgingival e condutos radiculares infectados (Castro e Lima 2010). A transição de *C.albicans*, um microrganismo comensal, para um patogênico depende de mudanças mínimas das condições predisponentes que causam expressão dos fatores de virulência. *Candida* spp tem sido isoladas em infecções endodônticas mistas (Chandra et al. 2010).

Candida spp tem a habilidade de crescer na superfície dentinária na ausência de tecidos e fluidos bucais e penetrar nos túbulos dentinários, na forma de blastosporos, pseudohifas ou hifas verdadeiras. Apesar de ser um microrganismo aeróbio, consegue se desenvolver em microaerofilia no interior do canal radicular (Chandra et al. 2010).

Fouad e colaboradores em 2002 revelaram que nas infecções endodônticas a presença de *C.albicans* é ocasional. Já Siqueira e colaboradores em 2003 e Lins e colaboradores em 2010 relataram que Waltimo e colaboradores em 1997 e Baumgartner e colaboradores em 2000 utilizando a técnica de PCR observaram a ocorrência de *C.albicans* em 7% de infecções persistentes de periápice e em 21% das amostras coletadas de canal radicular. E Jorge em 2007 relatou que leveduras do gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans* foram isolados em 10 a 20% dos casos de infecções primárias de canais radiculares e em 72% dos casos de infecções persistentes. Abrahão em 2007 encontrou *C. albicans* no interior do canal radicular em 21% dos pacientes.

Na última década o isolamento de *Candida albicans* do interior do conduto radicular tem variado de 1% a 21% (Chandra et al. 2010).

Neste estudo nos grupos de pacientes controle e tratados com o óleo essencial de *M. alternifolia*, leveduras foram isoladas de lesões primárias de canais radiculares em 30% desses canais sendo *C.albicans* em 25% e *Candida sp* em 5%.

Pesquisas também mostraram que proteases ácidas produzidas por essas leveduras podem estar envolvidas no processo de invasão tecidual, associadas com a adesão (Grubb et al., 2009; Rorig et al., 2009).

Na levedura a presença de regiões específicas na parede celular chamadas adesinas e no hospedeiro o correspondente nas células chamadas de receptores garantem a adesão entre os mesmos. O processo de adesão em diferentes superfícies foi demonstrado *in vitro* em células epiteliais descamadas da mucosa bucal, vaginal, urogenital ou corneocytes humano como células HeLa (carcinoma uterino humano), CCL-6, ou células endoteliais, segmentos de tecidos (discos teciduais gastrointestinal de ratos) e sistemas específicos, tais como o de coagulação (Samaranayake e MacFarlane,1982; Pires et al., 2001; Silva, 2007 e Grubb et al., 2009).

O fenômeno *switching* é reversível, de alta freqüência e permite aos fungos adaptarem-se às diferentes condições ambientais, inclusive ao organismo do hospedeiro (De Bernardis et al., 2001). Este fenômeno é refletido nas diferenças morfológicas existentes nas colônias de *Candida spp* e nas propriedades das superfícies celulares, com conseqüente alteração na aderência às células epiteliais, podendo também determinar a sensibilidade à atividade fúngica dos neutrófilos e as drogas antifúngicas (Gantner et al., 2005).

A camada mais externa da parede celular é o primeiro ponto de contato entre *C. albicans* e o endotélio do hospedeiro, (Pires et al., 2001; Gantner et al., 2005).

A filamentação da levedura inicia-se com a formação do tubo germinativo que resulta na pseudohifa e hifa verdadeira. Espécies do gênero *Candida*, como *C. albicans* formam tubo germinativo. O tubo germinativo aumenta a capacidade de adesão do microrganismo, o que pode explicar a maior incidência de *C. albicans* do que as demais espécies (Fidel e Sobel,

1996). Neste estudo nos grupos de pacientes controle e tratados com o óleo essencial de *M. alternifolia*, *C. albicans* foram isoladas de lesões primárias de canais radiculares em 25% dos 30% dos canais com leveduras.

Baseando-se nas diferenças de produção e extensão de franjas marginais pode correlacionar um morfotipo distinto com a capacidade de virulência (Hunter et al., 1989). Autores relatam que *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos e negativos apresentavam franjas contínuas com comprimento igual ou menor que 2 mm (Silva, 2007) e Ribeiro e colaboradores em 2006 que *C. albicans* isoladas de lesões da mucosa bucal de pacientes imunocomprometidos apresentavam franjas contínuas com comprimento até 5mm.

Neste estudo os morfotipos das cepas padrão e dos isolados de *C. albicans* apresentaram franjas contínuas com filamentos em paralelo com comprimento entre 3mm a 6 mm. E *C. albicans* isoladas dos canais radiculares dos pacientes tratados neste estudo apresentaram franjas contínuas com filamentos em paralelo em torno de 3mm.

A pesquisa de produção de franjas foi realizada nas concentrações sub-inibitórias do óleo essencial na cepa padrão de *C. albicans* e de cada isolado testado e a produção de filamentos frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* na ausência ou presença de tensoativos e solventes, ocorreu redução ou inibição dos filamentos em relação ao controle. Na literatura não encontrou-se trabalhos com essa análise.

5.2 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

O estudo inicia-se a partir de uma revisão etnofarmacológica, identificando as espécies mais utilizadas pela população e com atividade antifúngica, assim vários extratos de plantas, tinturas óleos essenciais e produtos opoterápicos tem sido testados sobre leveduras principalmente do gênero *Candida* (Araújo et al., 2004; Carvalho, 2004; Polachini, 2004; Oliveira, 2005; Lima et al., 2006; Abrahão, 2007; Duarte, 2007; Oliveira, 2007; Oliveira

et al., 2007, Silva, 2007; Costa et al., 2009; Costa et al., 2010; Cavalcante et al., 2011; Zuzarte et al., 2011)

As plantas possuem composições químicas complexas, envolvendo centenas de compostos em pequenas concentrações. Essa complexidade faz com que tenham aplicação em diversas doenças, e nem sempre umas estão relacionadas com as outras; podendo uma planta servir para mais de uma enfermidade quando aplicada como fitoterápico (Polachini, 2004).

Ferreira em 1998 relata ser muito comum que o extrato de uma planta medicinal seja uma mistura de substâncias. A separação em substâncias isoladas pode levar a perda do efeito farmacológico esperado.

A atividade farmacológica de uma substância extraída de planta pode depender de fatores como: local de cultivo, técnica de extração, metodologia de ensaio para o teste de sensibilidade e determinação da CIM entre outros (Adelmann, 2005).

Melaleuca alternifolia Chell conhecida como *Tea Tree* ou árvore de chá, é nativa da costa subtropical nordeste, região de New South Wales, Austrália, crescendo em regiões pantanosas ou próximas a rios. Seu óleo essencial possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos, alguns vírus, ácaros, microrganismos resistentes a antibióticos, além de forte atividade repelente contra mosquitos, pulgas, piolhos entre outros (Neves et al., 2012). Na Austrália devido às suas propriedades farmacológicas é utilizado em formulações farmacêuticas de vários produtos como shampoos, sabonetes, cremes dentais, anti-séptico bucal, repelente de insetos, produtos veterinários, germicidas de condicionadores de ar, dentre outros. Descoberto em 1920 por Penfold e Grant, o óleo é obtido por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor das folhas de *M. alternifolia*, que hoje é cultivada na Austrália em escala industrial para atender às demandas crescentes do mercado (Riedl, 1997).

O óleo essencial das plantas de *M. alternifolia*, cultivadas na Austrália, caracteriza-se pela mistura aproximada de 100 compostos, a maioria já identificados. Os principais constituintes são os compostos terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, pcimeno e álcoois sesquiterpênicos, que representam cerca de 90% do óleo. O

rendimento de óleo essencial para várias espécies do gênero *Melaleuca* é variável, dependendo de diversos fatores. Em *M. alternifolia* o rendimento é de aproximadamente 1 a 2% do peso fresco da planta utilizada (Carson et al., 2006).

O óleo pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol que são os principais constituintes relacionados à atividade antimicrobiana. O cineol é um conhecido irritante da pele e o terpinenol é apontado como o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes (Hammer et al., 2003 (a); Carson et al., 2006).

A qualidade comercial do óleo essencial de *M. alternifolia* é determinada pelas concentrações dos compostos terpinen-4-ol, e 1,8-cineol, que devem ser de no mínimo 30% e no máximo 15%, respectivamente (Carson e Riley, 1995).

Outros autores relatam que o óleo de boa qualidade contém quantidade iguais ou inferiores a 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinenol. (Hammer et al., 2003 (a); Carson et al., 2006).

Estudos sobre o teor, a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia* cultivada no Brasil, indicam que o óleo possui as mesmas características qualitativas e quantitativas do óleo australiano (Silva et al., 2002).

O'Brien e Dougherty em 2007 relatam que a qualidade de um fitoterápico tem implicações na sua eficácia e segurança. Variações no produto de um lote para outro ou de um fabricante para outro são inevitáveis, por isso devem se considerar as evidências de eficácia e ausência de toxicidade para cada extrato ou produto.

Morais, 2009 observa que a alteração dos compostos majoritários nos óleos essenciais, seja por fatores genéticos, técnicos bióticos ou abióticos podem influenciar diretamente na qualidade e conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos sobre patógenos humanos ou fitopatógenos, podendo levar entre, os autores, divergência entre resultados provenientes de ensaios realizados com as mesmas espécies vegetais e patógenos. Para minimizar estes equívocos nos resultados e evitar que dados

não conclusivos sejam publicados, o ideal é que, juntamente com os ensaios para verificação da atividade biológica, seja realizada a análise química dos óleos essenciais avaliados, para que se possa obter a caracterização fitoquímica destes.

A composição do óleo de *M. alternifolia* pode mudar com o passar do tempo devido a sua oxidação, particularmente quando exposto ao ar, mas também sofre mudança quando exposto ao ar e a temperaturas elevadas, quando o óleo se torna degradado os níveis de peróxido e de para-cimeno se elevam, e estes são o parâmetro para análise da qualidade do óleo (O'Brien e Dougherty, 2007).

Na pesquisa junto aos distribuidores brasileiros do produto observou-se que as empresas importam o produto da Austrália, envasam e o comercializam. Neste estudo, a opção foi adquirir o óleo essencial de *M. alternifolia* diretamente de um produtor australiano.

A "International Standard Organization" (ISO4730) define que o óleo essencial de *M. alternifolia* deve ter um nível mínimo de 30% de terpinen-4-ol e os níveis de cineol não deve ultrapassar 20% (O'Brien e Dougherty, 2007).

A análise cromatográfica do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel utilizado neste estudo está de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos pelo International Standard ISO 4730 (2004) (Anexo 6).

O pico mais alto foi o composto terpinen-4-ol com 38,12% de porcentagem relativa ao total da amostra, a este composto são atribuídas as propriedades antimicrobianas do óleo (Carson et al., 2006). Terpinen-4-ol é um terpeno com peso molecular 154.249 e é considerado o principal componente do óleo de *M. alternifolia* (European Commission for natural products 2004, Messeger et al 2005)

O segundo pico mais alto foi gama terpinoleno com (19,72 %) este composto possui propriedades antimicrobianas semelhantes ao Terpinen-4-ol. Encontrou-se também o composto para-cimeno com porcentagem relativa de 3,62%, A ISO 4730 estabelece como aceitáveis para este composto porcentagens entre 0,5% e 8%. Este componente esta relacionado a

degradação do óleo e é um dos principais responsáveis pela toxicidade (Carson et al., 2006). O composto 1,8 cineol também relacionado a toxicidade e degradação do óleo não foi encontrado na análise cromatográfica dessa amostra. Este autor ainda relata sempre ser dada preferência a utilização do óleo com baixos níveis de 1,8 cineol.

Messeger et al., 2005 utilizando óleo essencial de outro produtor australiano encontrou na análise cromatográfica porcentagens de 38,6% de terpinen-4-ol, semelhante a encontrada neste estudo.

Técnicas para os ensaios com óleos essenciais

São várias as metodologias empregadas para a pesquisa da CIM dos óleos essenciais frente as leveduras tais como: difusão em ágar, difusão em disco, macrodiluição e microdiluição em caldo) e as variações individuais como: tamanho do inóculo, temperatura, tempo de incubação e meio de cultura. Pelo exposto a comparação dos valores de CIM entre alguns estudos é dificultada.

A escolha do método de microdiluição em caldo para esta pesquisa deve-se ao fato deste método ser de baixo custo, sem necessidade de equipamentos complexos para leitura, ser mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de óleos essenciais e ter boa reprodutibilidade (Ostrosky et al., 2009).

Tensoativos e solventes

Nascimento e colaboradores em 2007 relatam que para uma boa qualidade das análises com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de, detergentes ou agentes tensoativos como o Tween 20, Tween 80, e os solventes DMSO e etanol, para uma emulsão dos óleos essenciais no meio de cultura. As propriedades destes agentes auxiliam na visualização dos resultados da atividade antimicrobiana dos óleos, entretanto podem conduzir a

possíveis interações com a substância testada, bem como produzirem atividade antimicrobiana.

Neste trabalho foram testados os dois tensoativos polissorbatos (Tween 20, Tween 80) e um solvente dimetilsulfóxido(DMSO).

Tween (20 e 80): conhecidos como polissorbatos, são tensoativos hidrofílicos solúveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo e água, como dispersantes ou solubilizantes de óleos. São surfactantes não iônicos, pouco tóxico para as membranas biológicas, constituídos por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. Estimulam a secreção de proteínas em microrganismos, além de alterar a morfologia e as superfícies da parede celular tanto de bactérias como de fungos. A relação entre fluidez da membrana e o aumento da secreção de enzimas fúngicas, o Tween facilita a solubilização dessas substâncias em meios aquosos e em solventes orgânicos (Giese *et al.*, 2004).

DMSO: conhecido como dimetil sulfóxido, composto que age como receptor de prótons em ligações de hidrogênio, confere sua afinidade com a água. Por essa razão é considerado um solvente atrópico, um subproduto da madeira sendo comercializado como um solvente comercial desde 1953. Para substâncias como proteínas e esteróides, o DMSO atua consideravelmente melhor como solvente quando comparado com a água. Em concentrações a 20% ou menores, também pode ser utilizado como anticongelante, já que sua ligação com o hidrogênio tende a formar uma matriz cristalina. Quando combinados com agentes tóxicos, a toxicidade do DMSO (que é relativamente baixa) aumenta significativamente. Facilita a penetração de substâncias nas membranas biológicas. O DMSO é de fácil penetração na pele não causando danos irreversíveis na membrana, o que o faz ser diferente dos outros solventes penetrantes (Gaylord Chemical Company, LLC – Technical Bulletin reaction solvent Dimethyl sulfoxide - DMSO, 2006).

Neste trabalho, para as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) observou-se ausência de atividade aos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e atividade fungicida entre 25% a 100% (2.500 a 10.000µg/mL) para o DMSO.

Embora não se tenha observado diferenças em relação à CIM e CFM, dos tensoativos e solvente optou-se pelo tensoativo Tween 20 para todos os ensaios, pelo fato da concentração ser a menor entre os dois tensoativos (20% de polissorbato), pela facilidade de homogeneização no meio de cultura, por não apresentar atividade fungicida. Apesar do Tween 80 apresentar os mesmos resultados que o Tween 20, não foi escolhido por se mais concentrado e com isso ser de difícil homogeneização no meio de cultura. Por outro lado Nascimento *et al* em 2007 recomendou a utilização do Tween 20 a 0,02% como emulsificador para os testes com óleo essencial.

A menor CFM 90 do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans* ocorreu na presença dos tensoativos, Tween 20 e Tween 80 a 0,02%.

5.3 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência e na presença dos tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) e do solvente DMSO sobre as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 90028 e ICB - 12 A) e isolados biológicos.

Sautour e colaboradores em 2004 consideraram significativa a atividade antimicrobiana, quando os resultados atingem valores < 200 µg/mL para compostos químicos isolados.

Neste estudo não foram encontrados isolados resistentes ao óleo essencial de *M. alternifolia*.

As CIM e CFM do óleo essencial de *M. alternifolia* frente a *C. albicans* na ausência de tensoativos ou solvente foram maiores que na presença dos tensoativos e solventes.

Mondello e colaboradores em 2003, avaliaram a atividade antifúngica do óleo de *M. alternifolia* acrescido de tween 80 sobre 47 isolados de *C. albicans* e encontraram uma CIM 50 de 0,125% e uma CIM 90 de 0,25% . Nestes os estudos dos isolados necessitaram de uma concentração maior de óleo essencial sendo a CIM 50 de 0,19% (156,25 µg/mL) e a CIM 90 de 0,78% (625 µg/mL).

Costa e colaboradores em 2010 avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *Candida* spp isolados da cavidade bucal de gestantes HIV positivas, mas utilizando a técnica de difusão em ágar, sendo neste caso difícil fazer as comparações conforme já relatado.

5.4 Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, sobre *C. albicans* no interior do canal radicular

Neste estudo a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, sobre *C. albicans* no interior do canal radicular foi em dentes humanos doados. Cardoso e colaboradores em 2008 relatam que muitos autores utilizam dentes bovinos para fazer ensaios em dentina, mas que não reproduz o ambiente ideal porque a dentina bovina possui túbulos dentinários maiores e mais permeáveis, facilitando assim a ação dos agentes antimicrobianos. Valera e colaboradores em 2009, na avaliação de combinação de clorexidina e hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, sobre *C. albicans* utilizaram dentes humanos.

5.5 Atividade *in vivo* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, no interior do canal radicular.

Foram estudados 20 pacientes de ambos os sexos com diagnóstico de necrose pulpar sendo 10 tratados com Paramonoclorofenol em Rinossoro com Polietilenoglicol 400 (PRP) PRP (Grupo 1 - Controle) e 10 tratados com óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 a 0,02% (Grupo 2).

A opção do tratamento do canal radicular *in vivo* com a concentração de óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel, 20% v/v (16.000µg/mL) acrescido de Tween 20 a 0,02% foi realizada com base na observação dos resultados onde a maior concentração utilizada foi 8.000µg/mL (10%) no teste *in vitro*. Para o

teste *in vivo*, com o objetivo de não se correr riscos dobramos essa concentração.

No tratamento do canal radicular *in vivo*, não foram isoladas leveduras nos tratamentos subsequentes a utilização do óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração a 20% v/v (16.000µg/mL) acrescido de Tween 20 a 0,02%. A levedura isolada com maior CFM foi a *Candida sp* (5.000µg/mL – 6,25%). Nas concentrações subinibitórias do óleo essencial sobre as leveduras isoladas dos canais radiculares nos pacientes ocorreu diminuição na produção de proteinase e fosfolipase bem como das franjas.

Neste estudo antes do início dos testes *in vivo* foi uma preocupação se conhecer relatos sobre alergias ao uso desse óleo essencial apesar do mesmo na cromatografia não apresentar cineol a substancia que se sabe causar irritação. Bagg e colaboradores em 2006 fazendo uma retrospectiva de casos de alergia cutânea ao óleo de *M. alternifolia* no Instituto do câncer de pele de Melbourne ao logo de 4,5 anos encontraram 1,8% da população alérgica ao óleo. Mas O'Brien e Dougherty em 2007, observaram que para uso tópico de formulações contendo óleo essencial de *M. alternifolia* com porcentagens inferiores a 25% não causavam irritação. E concentração utilizada neste estudo foi de 20% e portanto inferior a concentração que poderia causar infecção.

Em quatro dos dez pacientes do grupo 2 foi observado a presença de pús que foi drenado na primeira seção. Por segurança nestes casos foi administrado amoxicilina 500mg e metronidazol 400mg no pós operatório. Vale ressaltar que estas medicações não tem atividade sobre leveduras e neste caso o teste não foi prejudicado. Acrescentando que este óleo também tem efeito sobre bactéria em dosagens inferiores a utilizada nos pacientes.

Uma observação realizada no inicio da pesquisa e que fez com que se muda-se a conduta de trabalho o e que vale a pena ressaltar é que quando nas placas de microdiluição incluíamos o controle positivo (meio de cultura mais a suspensão de leveduras) estas não cresciam. E se concentração também que as tampas das placas de microdiluição apresentavam-se turvas devido a

evaporação do óleo essencial. Passou-se então a se fazer os controles em outra placa de microdiluição evitando assim a interferência do óleo essencial.

Esta observação pode fazer pensar que as substâncias químicas auxiliares muitas vezes não chegam em todos os espaços do dente e portanto não agem. E a par da impossibilidade do óleo essencial também não poder penetrar em todo o dente a ausência de crescimento microbiano, possa está relacionada a sua evaporação no interior do dente, tendo dessa forma uma atividade antimicrobiana efetiva.

Esperamos com esta pesquisa ter contribuído com um produto de baixo custo, baixa toxicidade, atividade antimicrobiana, regenerador tecidual e sem efeitos colaterais para o tratamento endodôntico.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados e nas condições em que foi conduzido o presente experimento, pode-se concluir que:

- O óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel na ausência ou na presença de tensoativos ou solvente apresentou atividade fungicida sobre todos os isolados de *C. albicans*.
- Os tensoativos Tween 20 (polissorbato 20) e Tween 80 (polissorbato 80) não apresentaram atividade fungicida e fungistática sobre as cepas padrão de *C. albicans*. Já o solvente DMSO apresentou atividade fungicida a 25% v/v (2.500µg/mL).
- A menor CFM 90 do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel sobre *C. albicans* ocorre na presença dos tensoativos, Tween 20 e Tween 80 a 0,02%.
- Nas concentrações subinibitórias do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *C. albicans* ocorreu diminuição na produção de proteinase e fosfolipase bem como redução do comprimento das franjas.
- Na avaliação *in vitro* da atividade do óleo essencial de *M. alternifolia* no interior do conduto radicular observou-se resistência de *C. albicans* em apenas um dente tratado com óleo essencial na concentração a 10% v/v (8.000µg/mL) com Tween 20 a 0,02%..
- No tratamento do canal radicular *in vivo*, não foram isoladas leveduras nos tratamentos subsequentes a utilização do óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração a 20% v/v (16.000µg/mL) com Tween 20 a 0,02%. A levedura isolada com maior CFM foi a *Candida sp* (5.000µg/mL – 6,25%). Nas concentrações subinibitórias do óleo essencial sobre as leveduras isoladas dos canais radiculares nos pacientes ocorreu diminuição na produção de proteinase e fosfolipase bem como das franjas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahão, DS. Atividade dos extratos de própolis sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* e como medicação intracanal [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

Adams RP, “Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy”, Allured Publishing, 4^o ed., 2007, 804p.

Adelmann J. Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. [Tese]. Curitiba: Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal do Paraná; 2005.

Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004;37:542-251.

Almeida LFD, Cavalcanti YW, Viana WP, Lima EO. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida albicans*. *Rev. Bras Ciênc Saúde.* 2010;14:51-56.

Almeida RBA, Carretto CFP, Santana RS, Furlan MR, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida spp.* *Revista de Odontologia da UNESP,* 2008; 37(2): 147-153.

Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, et al. Estudo comparativo de técnicas de *Screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova* 2008; 31(5): 1224-1229.

Alves PM, Leite PHAS, Pereira JV, Pereira LF, Pereira MSV, Higino JS, et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre

leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. Rev. Bras. Farmacogn, 2006; 16(2): 192 -196.

Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42(2): 222-224.

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Sâmania EFA, Sâmania Jr A, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 98: 367-373.

Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Filhos LS. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Revista de Patologia Tropical 2004; 33(1): 55-64.

Bagg J; Jackson MS; Sweeney MP; Ramage G; Davies AN. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. 2006; 42:487-492

Baumgartner J, Watts C, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infection of endodontic origin. J Endod. 2000;26:695-698.

Beatrice LCS, Aguiar CM, Silva CHV, Correia AL, Cavalcante RB. PCR and the microbiological Profile of Endodontic Infections: Reality or Utopy? Odontologia Clínico-Científica. 2008;7(4):295-298.

Biswas S, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M. Effect of pH, carbon source and K⁺ on the Na⁺-inhibited germ tube formation of *Candida albicans*. Med Mycol. 2000;38(5):363-369.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de

Medicamentos/Ministério da Saúde, Secretária de Ciência,Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica.- Brasília: Ministério da Saúde, 2006.148 p.

Bretz W, Chiego DJ, Marcucci M, Cunha I, Custódio A, Schneider L. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. Z Naturforsch C.1998 53(11-12):1045-1048.

Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet PJ, Rispaill P, Lachaud L. Antifungal Susceptibility of 205 *Candida* spp. Isolated Primarily during Invasive Candidiasis and Comparison of the Vitek 2 System with the CLSI Broth Microdilution and Etest Methods. Journal of Clinical Microbiology.2010; 48: 154–161.

Calamari SE, Bojanich MA, Barembaum SR, Berdicevski N, Azcurra AI. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 1;16 (1):23-28.

Cardoso M, de Oliveira L, Koga-Ito C, Jorge A. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 105(3):85-91.

Carson C, Riley T, Cookson B. Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. J Hosp Infect. 1998;40(3):175-178.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties Clin Microbiol Rev.2006;19(1):50-62.

Carvalho JCT. Fitoterápicos – aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Editora Tecmedd; 2004

Castro RD, Lima EO. Antifungal activity of the essential oils from *Eucalyptus*

globulus L. on *Candida* spp. Rev Odontol UNESP. 2010; 39(3): 179-184.

Castro C, Silva ML, Pinheiro AL, Jacovine LAG. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. Rev. Árvore 2005; 29(2):241-249 .

Cavalcanti YW, Pérez AL, Xavier GDR, Almeida LFD. Inhibitory effect of essential oils against organisms from root canal. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(5):208-214.

Chandra SS, Miglani R, Srinivasan MR, Indira R. Antifungal Efficacy of 5.25% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine Gluconate, and 17% EDTA With and Without an Antifungal Agent. Journal of endodontics. 2010;(36):675-678.

Costa CR, et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]. 2010; 52(3):139-143.

Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Revista de Odontologia da UNESP. 2009; 38(2): 111-116.

Costa ACBP, Rodrigues TG, Ferreira TM, Silva FS, Aguida M, Khouri S. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal de gestantes HIV positivas. Rev Inst Adolfo Lutz. 2010; 69(3): 403 – 407.

Cury A.E. Testes de Suscetibilidade com Antifúngicos in Vitro. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo. Apostila. 1998.

De Bernardis, F.; Sullivan, A.; Cassone, A.; Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. Med. Mycol., 2001; 39: 303-313.

Delgado W, Aguirre J. Oral mycoses in the AIDS era. *Rev Iberoam Micol.* 1997;14(1):14-22.

Duarte, ESM. Crescimento e teor de óleo essencial em plantas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* tratadas com homeopatia [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

Ferreira SH, Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9: (3) 335-348.

Fouad, A.F. Barry.J. Caimano, M. Clawson, M. Zhu, Q. Carver, R. Hazlett,K. Radolf, J.D. PCR-Based, identification of bacteria associated with endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology.*2002;40: 3223-3231.

Gantner, B. N.; Simmons,R. M.; Underhill, D.M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 2005. 24:1277-1286.

Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today* 2009;14(3-4):214-222.

Giese EC, Covizzi LG, Dekker RFH, Barbosa AM. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* 2004; 26(4): 463-470.

Gaylord Chemical Company, LLC. Technical Bulletin Reaction Solvent Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Slidell, LA. USA. [acesso em 01 jun 2011]. Disponível em: <http://www.gaylordchemical.com/bulletins/bulletin105b/index.php>

Grubb SEW. et al. Adhesion of *Candida albicans* to Endothelial Cells under Physiological Conditions of Flow. *Infect. Immun.* 2009;77:3872-3878.

Halcón L, Milkus K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am J Infect Control.* 2004;32(7):402-408.

Hammer KA, Carson C, Riley T. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro* *J Appl Microbiol.* 1999;86:446–452.

Hammer KA, Carson C, Riley T. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.* 2003;95(4):853-860(a).

Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak E, Carson C, Riley T. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(6):389-392 (b).

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:1081–1085.

Hunter P, Fraser C. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1989;27(10):2156-6210.

Ibrahim AS, Mirbord F, Filler SG, Banno Y, Cole, Kitajima Y. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1995; 63:1993-1998.

Informativo Técnico de produto:óleo de Melaleuca.Pharma Special:2004

International Organization for Standardization.ISO/FDIS 4730 (2004) final draft,International standard of Melaleuca,terpinen-4ol type(tea tree oil).

Jorge AOC. Microbiologia bucal 3º Ed. Santos 2007, 198p.

Kantarcioğlu AS, Yücel A. A Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002; 45:160-165.

Kumar R, Skula PK. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biol* 2010;(114):189-197.

Kreger –Van Rij. The yeast: a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier, 1984. 1082p.

Kurtzmann CP, Fell JW. The yeast: a taxonomic study. 4 ed. New York. Elsevier 1998.

Lacaz, CS. Tratado de micologia médica Lacaz. 9ª edição. São Paulo: Sarvier; 2002.

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

Lins CCSA, Lima GA, Travassos RMC. Participação dos fungos nas infecções endodônticas. *Int J Dent*. 2010;9(4):215-219.

Martins, CAP. et al. Presence of *Candida* spp. in chronic periodontitis patients. *Cienc Odontol Bras*, 2002 5(3): 75-83.

Menezes EA, Monteiro MNR, Parente TM, et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isolado da cavidade oral de pacientes HIV positivos em Fortaleza, Ceará. *J. Bras. Patol. Méd. Lab*. 2006; 42:253-256.

Messenger S, Hammer KA, Carson CF, Ryley TV. Effectiveness of hand-cleaning formulations containing tea tree oil assessed ex vivo on human skin and in vivo

with volunteers using European standard EN 1499. J Hosp Infec 2005;59(3):220-228.

Mitrovic S, Kranjcic-Zec I, Arsic V, Dzamic A. In vitro proteinase and phospholipase activity and pathogenicity of *Candida* species. J Chemotr. 1995;7(4):43-45

Molina FP, Majewski M, Perrela FA, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. Cienc Odontol Bras. 2008; 11 (2): 86-93.

Mohan V, Ballal M, Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 208-210

Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. J. Antimicrob. Chemother.. 2003;51(5):1223-1229.

Morais, LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. Horticultura Brasileira. 2009; 27 (2): 4050 – 4063.

Naglik JR, Rodgers CS, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglick LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in Humans correlates with active oral and vaginal infections. J. Infect. Dis. 2003;188: 469-479 (a).

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secretes aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 2003;67:400-428 (b).

Naglik JR, Albercht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol. 2004; 6:915-926.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Junior AMB, Trindade R. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev. Bras. Farmacog. 2007;17(1): 108-111.

Netea, M. G. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nat. Rev. Microbiol. 2008; 6:67-78.

Neves RCSM, RHS, Mendonça AJ, Lima SR, Cruz FACS, Rosa JG, Mateus LAF, Ferraz V, Barros LA. Efeito acaricida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Otodectes cynotis* Rev. Bras. Ciên. Vet., 2012;19(3):144-148.

O'Brien P; Dougherty T. The effectiveness and safety of Australian Tea tree oil. 2ª edição Rural Industries Research and Development Corporation; 2007

Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:466-476.

Oliveira, GF. Avaliação da atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Jambalão). [Dissertação]. São Paulo: Universidade de Franca; 2005.

Oliveira JC, Alves FR, Uzeda M, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Influence of Serum and Necrotic Soft Tissue on the Antimicrobial Effects of Intracanal Medicaments Braz Dent J. 2010;21(4):295-300.

Oliveira, LE. Atividade do extrato de própolis verde sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes HIV positivo e de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV. [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

Ostrosky, Elissa A. et al . Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. bras. farmacogn. 2009; 18(2): 301-307.

Oxman et al . Candidemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1460–1465

Paisano A, Spira B, Cai S, Bombana A. *In vitro* antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(5):327-330.

Paiva JG, Antoniazzi JH. Endodontia Bases para a pratica clínica 2 ed.São Paulo; Artes Médicas, 1991.

Patel M, Gulube Z, Dutton M. The effect of *Dodonaea viscosa var. angustifolia* on *Candida albicans* proteinase and phospholipase production and adherence to oral epithelial cells. J Ethnopharmacol. 2009;124(3):562-565.

Pereira CA, da Costa AC, Machado AK, Beltrame Júnior M, Zöllner MS, Junqueira JC, Jorge AO. Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil by *Candida* Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. Mycopathologia. 2010 12. [Epub ahead of print].

Pfaller M, Burmeister L, Bartlett M, Rinaldi M. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988;26(8):1437-1441.

Phongpaichi, S. Mackenzie, D.W.R. Fraser, C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. Epidemiol. Infect. 1987; 99: 421-428.

Pires MFC, Birman EG, Costa CR, Gambale W, Paula CR. *Candida albicans* biotypes isolated from the oral cavity of HIV-positive patients. Rev. Microbiol.

1996; 27:46-51.

Pires MFC, Correa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes a and b) adherence in vitro. Brazilian Journal of Microbiology. 2001; 32: 163-169.

Polachini, C.O. Avaliação "in vitro" da atividade anti-*Candida albicans* de extratos de plantas "exóticas" brasileiras. Tese de Mestrado, Coordenação dos Institutos de Pesquisa, Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo, 2004.

Price M, Wilkinson I, Gentry L. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982;20(1):7-14.

Reichling J, Fitz J, Hellmann K, Wegener T, Bucher S, Saller R. Topical tea tree oil effective in canine localised pruritic dermatitis--a multi-centre randomised double-blind controlled clinical trial in the veterinary practice. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2004;111(10):408-414.

Ribeiro, E. L., Scroferneker, M. L., Cavalhaes, M. S. et al. Aspectos fenotípicos de cepas de *Candida albicans* orais em crianças com síndrome de Down. Braz. J. Biol. 2006, 66: 939-944.

Rield R.W. Practical methods for using tea tree oil. Agro-Food Industry Hi-Tech. 1997;8:34-36.

Rorig KCO, Colacite J, Abegg MA. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009 42(2): 225-227.

Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982;20(3):233-244.

Ruff MI, Mc.Clanaham SB, Babel SB. "In vitro" antifungal Efficacy of four irrigants as a final rinse. Journal of Endodontics, 2006; 32: 331-333

Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol.* 1992; 73:171-180.

Samaranayake LP, MACFARLANE TW. Factors affecting the *in vitro* adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch Oral Biol*, 1982; 27(10):869-873.

Sautour M. et al. Antifungal Steroid Saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Médica* 2004; 70:90-92.

Sherry E, Boeck H, Warnke PH. Percutaneous treatment of cronic MRSA osteomyelitis with a novel plant-derived antiseptic. *BMC Surg* 2001;1:1.

Silva FB, Almeida JM, Sousa, SM Galvão. Medicamentos naturais na Endodontia: estudo comparativo da ação antiinflamatória. *Braz. oral res.* 2004, 18: 174-179.

Silva MRR. Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS., Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, 1999.

Silva, RC. Comportamento morfológico de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*: sensibilidade a antifúngicos e ao extrato etanólico de própolis [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

Silva SRS; Demuner AJ; Barbosa LCA; Casali VWDC; Nascimento EAN; Pinheiro AL. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Scientiarum*, 2002; 24(5): 1363 – 1368.

Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6º Ed. Porto Alegre,

Universidade/UFRGS 2007, 1104p.

Siqueira JJ, Sen B. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632-641.

Siqueira JJ. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-293.

Siqueira JJ. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J.* 2003 ;36(7):453-463.

Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002;28:304-310.

Tenney D. Tea tree oil. 1edição. pleasant Groove: Woodland Publishing; 1996.

Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol.* 1987;3(2):86-90.

Turk BT, Alves M, Sen BH, Turkey I. The effect treatment of radicular dentin on colonization patterns of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endon.* 2008; 106(3):457-462.

Valera MC, Silva KCG, Maekawa LE, Carvalho CAT, Koga-itoCY, Camargo CHR, Lima RS. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medications *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):555-559.

Vazquez J, Arganoza M, Boikov D, Akins R, Vaishampayan J. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17(2):60-63.

Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, et al. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endod Topics* 2004;9:66–78

Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, et al. Fungi in therapy resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:96–101

Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS. et al. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40:272-276.

Zohreh A, Mandana N, Maryam J, Yasaman M, Fatemeh M, AnahitaT, Pharm D, Effect of Propolis on Dentin Regeneration and the Potential Role of Dental Pulp Stem Cell in Guinea Pigs. *Cell Journal(Yakhteh)*,2012;13(4):223-228.

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhot J, Vale-Silva L, Silva MJ, Pinto E, Salgueiro L. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J Med Microbiol.* 2011; 60:612-618.

Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859



São Paulo, 07 de agosto de 2009.

Protocolo: 32/2009

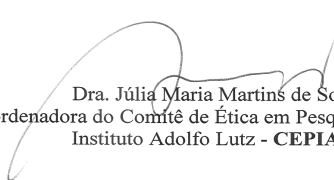
Projeto de Pesquisa – **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) sobre *Candida albicans* no interior do canal radicular in vitro e como medicação intra-canal.**

Pesquisador Responsável: Maria de Fátima Costa Pires

Prezado Pesquisador:

O **Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL** analisou e deliberou em sua reunião ordinária de **03 de abril de 2009**, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado e deliberou na condição de **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade à Resolução 196/96 são deveres de(a) pesquisador(a): **a)** comunicar de imediato, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração, depois da manifestação do CEPIAL; **b)** manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, no caso de eventual auditoria; **c)** comunicar formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto; **d)** elaborar e apresentar relatórios parciais e finais; **e)** justificar perante o CEPIAL, a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

Anexo 2 - Termo de doação de dentes humanos - cirurgiões-dentistas

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS DE CIRURGIÕES-DENTISTAS

Eu, _____,
cirurgião-dentista, inscrito no CRO _____, com consultório situado na
_____,
bairro _____, cidade _____, UF _____,
CEP _____, telefone _____, dôo _____ dentes para o
desenvolvimento de pesquisa científica, apresentada a comissão científica do Instituto
Adolfo Lutz ciente de que o(s) mesmo(s) será(ão) utilizado(s) em experimentos
laboratoriais visando o combate à infecção dentária, declarando que estes dentes
foram extraídos por indicação terapêutica, cujos históricos fazem parte dos prontuários
dos pacientes de quem se originam, arquivados sob minha responsabilidade. Estou
ciente de que estes dentes serão utilizados pelo pesquisador desta instituição na
realização de pesquisas.

São Paulo, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura Cirurgião Dentista
Pesquisador: Viviane Reis Storto
CROSP 74360

Assinatura

Anexo 3 - Termo de doação de dentes humanos - pacientes

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS DE PACIENTES

Eu, _____,
natural de _____, sexo M F , Idade: _____anos, residente
à _____, telefone
_____, RG _____, aceito doar
o(s)dente(s)_____

para o desenvolvimento de pesquisa científica, apresentada a comissão científica do Instituto Adolfo Lutz ciente de que o(s) mesmo(s) será(ão) utilizado(s) em experimentos laboratoriais visando o combate à infecção dentária. Estou consciente de que este(s) dente(s) foi(ram) extraído(s) por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado em meu prontuário. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. Será preservada a minha identidade na execução, redação da pesquisa e na divulgação.

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do doador ou responsável

Pesquisador: Viviane Reis Storto
CRO-SP 74.360

Assinatura

Testemunha

Anexo 4 : Termo de Consentimento Esclarecido - Grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

(Grupo controle)

A presente pesquisa tem como objetivo estudar o efeito da solução de tea tree como medicação intra-canal.

Sua colaboração é espontânea e caso você concorde se dará da seguinte maneira:

Você fará parte do grupo controle desta pesquisa onde a medicação utilizada será a usual para o tratamento de canal (Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglico 400 em Rinossoro® (PRP))

- Inicialmente será coletada uma amostra de material do interior do canal do dente afetado usando um cone de papel absorvente esterilizado.
- Após limpeza do canal, será aplicada medicação usual para o tratamento de canal (Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglico 400 em Rinossoro® (PRP)) e o dente será fechado com curativo provisório. E você retornará depois de uma semana para uma nova coleta e continuação do tratamento de canal. Não deverá ocorrer nenhum desconforto a você além daquele causado pelo tratamento usual de canal.

É importante que fique claro, que em nenhum momento você se sinta forçado a participar desta pesquisa. A sua participação é voluntária e caso aceite participar, nada impede que saia deste estudo a qualquer momento. Isto não prejudicará o seu tratamento odontológico que continuará normalmente de acordo com o plano de tratamento pré-estabelecido.

Será garantido total sigilo quanto a sua identidade, e ninguém fora desse projeto terá acesso as informações, e toda e qualquer observação será informado a você. Você ainda poderá sempre que desejar solicitar informações adicionais que julgar necessária para o seu esclarecimento. Você não terá despesas pessoais para receber este tratamento.

“Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que lí, ou que foram lidas para mim, descrevendo que faço parte de um grupo controle da pesquisa que utiliza o extrato de própolis, como medicação no tratamento do canal do dente, mas que o canal do meu dente será tratado com medicação usual (Paramonoclorofenol associado ao Polietilenoglicol 400 em Rinossoro® (PRP)) e por isso concordo em participar voluntariamente da pesquisa bem como poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos ao meu tratamento”.

Nome do paciente em letra de forma

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável pelo estudo
C.D. Viviane Reis Storto
Tel. (11) 83814828 ou (11)38126702.

Testemunha

Data ___/___/_____

Anexo 5 : Termo de Consentimento Esclarecido - Grupo experimental

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

A presente pesquisa tem como objetivo estudar o efeito do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) como medicação intra-canal.

O tea tree é um medicamento natural fornecido especialmente para essa pesquisa por uma indústria farmacêutica conceituada (Thursday Plantation), dentro dos prazos de validade e sem qualquer contra-indicação ao seu uso, salvo nos casos que relatarem alergia ou reações ao uso de eucalipto ou seus derivados. Para tanto é importante que informe se já teve alergia ou reações ao uso de eucalipto e seu derivados para que sua saúde não seja prejudicada ou colocada em risco.

Sua colaboração é espontânea e caso você concorde se dará da seguinte maneira:

- Inicialmente será coletada uma amostra de material do interior do canal do dente afetado usando um cone de papel absorvente esterilizado.
- Após limpeza do canal, será aplicada a solução de tea tree e o dente será fechado com curativo provisório. E você retornará depois de uma semana para uma nova coleta e continuação do tratamento de canal. Não deverá ocorrer nenhum desconforto a você além daquele causado pelo tratamento usual de canal.

Este estudo poderá trazer benefício direto a você. Mas é importante que fique claro, que em nenhum momento você se sinta forçado a participar desta pesquisa. A sua participação é voluntária e caso aceite participar, nada impede que saia deste estudo a qualquer momento. Isto não prejudicará o seu tratamento odontológico que continuará normalmente de acordo com o plano de tratamento pré-estabelecido.

Será garantido total sigilo quanto a sua identidade, e ninguém fora desse projeto terá acesso as informações, e toda e qualquer observação será informado a você. Você ainda poderá sempre que desejar solicitar informações adicionais que julgar necessária para o seu esclarecimento. Você não terá despesas pessoais para receber este tratamento.

“Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que lí, ou que foram lidas para mim, descrevendo a utilização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, como medicação no tratamento do canal do meu dente. E por isso concordo em participar voluntariamente da pesquisa bem como poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos ao meu tratamento”.

Nome do paciente em letra de forma

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável pelo estudo
C.D. Viviane Reis Storto - CROSP 74.360
Tel. (11) 83814828 ou (11) 38126702.

Testemunha

Data ____ / ____ / ____

Anexo 6 – International Organization of Standardization ISO 4730 /2004

Requirements:		
Appearance	Clear, mobile liquid	
Colour	Colourless to pale yellow	
Odour	Characteristic	
Relative density (20° C)	Min: 0.885	Max: 0.906
Refractive index (20° C)	Min: 1.475	Max: 1.482
Optical rotation (20° C)	between + 5° and + 15°	
Miscibility in ethanol (20° C)	not necessary to use more than 2 volumes of ethanol, 85% (volume fraction) to obtain a clear solution with 1 volume of essential oil	
Flashpoint (closed cup)	mean value	mean value
Min volume of sample	50 ml	

Chromatographic profile:			
Component		Min %	Max %
α -Piniene		1	6
Sabinene		trace	3.5
α -Terpinene		5	13
Limonene		0.5	1.5
p-Cymene		0.5	8
1,8-Cineole		trace	15
γ -Terpinene		10	28
Terpinolene		1.5	5
Terpinen-4-ol		30	48
α -Terpineol		1.5	8
Aromadendrene		trace	3
Ledene (syn. viridiflorene)		trace	3
δ -Cadinene		trace	3
Globulol		trace	1
Viridiflorol		trace	1

Anexo 7 - Microrganismos testados com o óleo de *Melaleuca alternifolia* e que foram eliminados nas Concentrações abaixo.

BACTERIA GRAM POSITIVA	MIC(%v/v)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5-1.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.5-1.0
<i>Streptococcus pneumonia</i>	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.0
<i>Streptococcus pyrogenes</i>	1.0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1.25
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.75
<i>Beta haemolytic streptococcus</i>	0.5
BACTERIA GRAM NEGATIVA	MIC(%v/v)
<i>Escherichia coli</i>	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.0-2.0
<i>Citrobacter spp.</i>	0.5-1.0
<i>Shigella sonnei</i>	0.5
<i>Proteus mirabilis</i>	0.5-1.0
<i>Legionella spp.</i>	0.75-1.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.0
FUNGO	MIC(%v/v)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0.75
<i>Trichophyton rubrum</i>	0.5
<i>Aspergillus Niger</i>	1.0
<i>Aspergillus flavus</i>	0.25
<i>Candida albicans</i>	0.5
<i>Microsporum canis</i>	1.0
<i>Microsporum gypseum</i>	1.0
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	1.2

Fonte: Equipe Harmonica - <http://www.equipeharmonica.com.br/portal>
 Criado por Joomla!
 Produzido em: 1 July, 2008, 00:57

Anexo 8 - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA USP
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA – SEÇÃO DE MICOLOGIA
LABORATÓRIO DE LEVEDURAS

Procedência: _____ Registro: _____

Observações _____

1. Exame direto _____

2. Crescimento em meios usuais _____
Crescimento em meio ácidos graxos _____

3. Microcultivo e tubo germinativo _____

PM: BL: AR: TG: MV: CL: Outros: _____

4. Ascos e Ascósporos
Positivo _____ Negativo _____ Forma _____ Número _____ Local _____

5. Outras provas:
Síntese de amido _____ Prod. Melanina _____ TTC _____

6. Auxanograma:
KNO³: _____ Peptona: _____ Glicose: _____ Inositol: _____ Sacarose: _____ Lactose: _____
Dulcitol: _____ Xilose: _____ Rafinose: _____ Celobiose: _____ Melibiose: _____
Trealose: _____ Ramnose: _____ Maltose: _____

7. Zimograma:
Glicose: _____ Maltose: _____ Lactose: _____ Sacarose: _____

Diagnóstico: _____

Anexo 9 – Relatório de coleta e isolamento de leveduras.

Relatório Coleta e Isolamento de leveduras do canal radicular de pacientes portadores de necrose pulpar

N	<input type="text"/>	Nome <input style="width: 95%;" type="text"/>	Idade	<input type="text"/>	RG: <input style="width: 95%;" type="text"/>
Dente Num.	<input type="text"/>	Data 1 coleta	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> + Leveduras <input type="checkbox"/> + Microorg.	Data 2 coleta <input type="text"/> <input type="checkbox"/> + Leveduras <input type="checkbox"/> + Microorg.
Pré operatório		Entre sessões		Segunda sessão	
<input type="checkbox"/> Abscesso	<input type="checkbox"/> Drenou?	<input type="checkbox"/> Dor	<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Canais secos	<input type="checkbox"/> Inicial
<input type="checkbox"/> Dor		<input type="checkbox"/> Gosto ruim	<input type="checkbox"/> Irritação	<input type="checkbox"/> Exudato	<input type="checkbox"/> Final
<input type="checkbox"/> Mau cheiro		<input type="checkbox"/> Ardência	<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> Mau cheiro	<input type="checkbox"/> Controle P.O.
Observações: <input style="width: 95%; height: 40px;" type="text"/>					

N	<input type="text"/>	Nome <input style="width: 95%;" type="text"/>	Idade	<input type="text"/>	RG: <input style="width: 95%;" type="text"/>
Dente Num.	<input type="text"/>	Data 1 coleta	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> + Leveduras <input type="checkbox"/> + Microorg.	Data 2 coleta <input type="text"/> <input type="checkbox"/> + Leveduras <input type="checkbox"/> + Microorg.
Pré operatório		Entre sessões		Segunda sessão	
<input type="checkbox"/> Abscesso	<input type="checkbox"/> Drenou?	<input type="checkbox"/> Dor	<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Canais secos	<input type="checkbox"/> Inicial
<input type="checkbox"/> Dor		<input type="checkbox"/> Gosto ruim	<input type="checkbox"/> Não há	<input type="checkbox"/> Exudato	<input type="checkbox"/> Final
<input type="checkbox"/> Mau cheiro		<input type="checkbox"/> Ardência	<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> Mau cheiro	<input type="checkbox"/> Controle P.O.
Observações: <input style="width: 95%; height: 40px;" type="text"/>					

N	<input type="text"/>	Nome <input style="width: 95%;" type="text"/>	Idade	<input type="text"/>	RG: <input style="width: 95%;" type="text"/>
Dente Num.	<input type="text"/>	Data 1 coleta	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> + Leveduras <input type="checkbox"/> + Microorg.	Data 2 coleta <input type="text"/> <input type="checkbox"/> + Leveduras <input type="checkbox"/> + Microorg.
Pré operatório		Entre sessões		Segunda sessão	
<input type="checkbox"/> Abscesso	<input type="checkbox"/> Drenou?	<input type="checkbox"/> Dor	<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Canais secos	<input type="checkbox"/> Inicial
<input type="checkbox"/> Dor		<input type="checkbox"/> Gosto ruim	<input type="checkbox"/> Não há	<input type="checkbox"/> Exudato	<input type="checkbox"/> Final
<input type="checkbox"/> Mau cheiro		<input type="checkbox"/> Ardência	<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> Mau cheiro	<input type="checkbox"/> Controle P.O.
Observações: <input style="width: 95%; height: 40px;" type="text"/>					