UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RAFAELA ALVES DA SILVA ALAVARCE

Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite
protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e
anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial
citotóxico sobre células epiteliais do palato humano

BAURU

2014

RAFAELA ALVES DA SILVA ALAVARCE

Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite
protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e
anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial
citotóxico sobre células epiteliais do palato humano

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências no Programa
de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área
de concentração Patologia Bucal.

Orientador: **Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara**

Versão Corrigida

BAURU

2014

Al12f Alavarce, Rafaela Alves da Silva
Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano / Rafaela Alves da Silva Alavarce. - Bauru, 2014.

135p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara.

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru,

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: CAAE: 6706412.2.0000.5417.
Data: 08/11/2012

DEDICATÓRIA

Aos meu país, Celso e Terezinha

*Por terem tido uma vida exclusivamente voltada para dar a mim
e ao meu irmão o que podiam, sempre focando na nossa
educação, caráter e dignidade. Amo vocês.*

Ao meu querido esposo, Felipe

*Pelo amor, pela confiança, pela compreensão e pela paciência.
Por me ensinar a levar a vida de forma mais leve, a encarar as
dificuldades e me ensinar a ser forte. Nessa etapa importante você
foi um elemento essencial!!!*

Carinhosamente ao meu irmão, Ricardo

*Exemplo de determinação, foco diante da vida...Ele mostrou pra
mim logo cedo que quando se tem um sonho é possível correr atrás
e torná-lo realidade!!!*

*“Quando não souberes para onde ir,
olha para trás e sabe pelo menos de onde vens” .*

(Provérbio africano)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, saúde, bênçãos, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida. Por ter me concedido grandes presentes meu emprego, minha família e meu marido!!!

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto e realizar um sonho, acreditando no meu potencial e por ter me dado a honra de conhece-la como pessoa e profissional maravilhosa!!! Obrigada pelo acolhimento, pelas palavras de apoio, pelos conselhos, pela paciência e pela confiança. Deus não poderia ter me dado orientadora melhor que você, amiga, honesta, dedicada e humana. As palavras não são capazes de expressar a minha admiração por você. Obrigada por tudo!!!

*“A você, que todos os dias
Deixa seus filhos em casa,
Muitas das vezes,
Com vontade de ficar...
E vem para a sala de aula
Aos filhos de outras ensinar.
A você que corre, trabalha,
Sofre, chora...
E sempre tem um sorriso
Para seus alunos,
Que mesmo complicados
Amam você,
Que aprenderam a amar-te
E admirar-te.*

*A você, símbolo de
sabedoria,
Que acima de tudo, sabe ser
amiga,
Exigente e disciplinada
Guia seus alunos nesta
longa estrada.
És estrela maior em sala de
aula,
És o sol de seu lar,
É mãe-professora
Ser humano
Digno de se amar”.*

(Penha Carvalho – Adaptado)

Ao Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, que tanto me ensinou como professor e coordenador frente ao Centro Integrado de Pesquisa. Obrigada por esses cinco anos de convívio, pela confiança, por acreditar no meu potencial e por ajudar no meu desenvolvimento profissional, me apoiando e me incentivando. Obrigada por ter possibilitado a realização de um sonho, a pós-graduação.

Aos professores da Disciplina de Patologia da FOB pelos ensinamentos e orientações. Obrigada ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, pelo exemplo de respeito, humildade, simplicidade, alegria e carinho pelos seus alunos. Obrigada à Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, com quem muito aprendi durante este período. Obrigada ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, por ensinar patologia com paixão, pela sua didática maravilhosa.

A querida amiga e madrinha Ana Regina Casaroto Moreschi, sem palavras para descrevê-la... dedicada, perfeccionista, sincera, ética, profissional excelente, honesta e humildade sem igual. Para mim um exemplo a ser seguido. Se um dia pudesse escolher ser igual a alguém, esta pessoa seria você!!! Obrigada pela ajuda durante o mestrado, com as estatísticas, os seminários, as lâminas de patologia oral e obrigada pelos conselhos, por me ouvir, pelo companheirismo e carinho.

A querida amiga Nara Lígia Martins Almeida, pela amizade, carinho e dedicação!!! Obrigada por sua alegria contagiante, por estar sempre disposta a me ajudar e pelo companheirismo em todas as horas. Você é meu braço direito!!!

À Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro pela nossa parceria, por acreditar no meu potencial e abrir as portas do seu laboratório para que realizasse toda parte de extração da planta, identificação, pelos contatos em Araraquara para que pudesse realizar os experimentos de espectrometria. Obrigada pela confiança, pela disponibilidade e pela paixão contagiante no trabalho com os fitoterápicos.

Ao Ms. Leonardo Saldanha pela amizade e disposição em auxiliar nos experimentos de espectrometria de massas, identificação dos compostos e toda parte relacionada a química do fitoterápico. Sem sua ajuda nada disso seria possível!!! Obrigada pelas aulas de química e pela paciência!!!

Ao Jardim botânico de Bauru, na pessoa do diretor Luís Carlos Almeida Neto, que viabilizou a realização do projeto através da coleta do material vegetal. Muito obrigada!!!

À Profa. Dra. Carla Andreotti Damante, do Departamento de Prótese, Disciplina de Periodontia da FOB-USP, por permitir a coleta das amostras de tecido epitelial palatal na Clínica de Periodontia desta faculdade.

A Profª. Drª. Elidiane Cipriano Rangel, por ter me auxiliado com dúvidas que surgiram durante a elaboração da discussão da dissertação e por ter me aberto as portas do seu departamento.

A todos os voluntários da pesquisa, sem os quais este trabalho não seria possível. Meus profundos agradecimentos!

Ao funcionário da Disciplina de Farmacologia, Ms. Thiago José Dionísio, por toda atenção e ajuda na descrição dos experimentos de RT- qPCR para envio a Fapesp.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia e amigas, Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Felipe e Marina Dos Santos Corrêa, por toda ajuda durante esses dois anos do mestrado, permitindo que tudo ocorresse de forma organizada. Obrigada pela amizade e ajuda!

Aos funcionários do CIP: Ms Márcia Sirlene Zardin Graeff, por ter contribuído com a captura e análise das imagens através da microscopia de varredura confocal; Neusa Caetano Barbosa; e em especial aos companheiros de trabalho e amigos Marcelo Milanda e Renato Pereira Murback, que sempre compartilharam dos meus momentos durante o mestrado, me auxiliando e socorrendo nas atribulações. Muito obrigada pela compreensão e companheirismo.

Aos funcionários da Disciplina de Bioquímica Thelma Lopes Silva, Alíne de Lima Leite, que sempre atenderam meus pedidos de ajuda.

À amiga Karen Henriette Pinke, pela amizade e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Pelos momentos de descontração e por estar presente em minha vida nos momentos mais difíceis!!! Por ter compartilhado comigo momentos alegres, de muitas risadas, tristezas, medos, muito estudo e aprendizado... Obrigada também pela força que me concedeu com a documentação da FAPESP.

Ao amigo Heliton Gustavo de Lima, por ser essa pessoa alegre, contagiante e sempre muito carinhoso e pronto a nos dar um abraço e ombro amigo!!!

Aos amigos Pepe Burgos, Taiane Gardizani pelos momentos de descontração. Aprendemos muito juntos!!!

A amiga Flávia Amadeu, pela amizade, carinho, por dividir aflições e alegrias e pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos demais amigos da Patologia: Ana Paula Maddi, Francisco Abreu, Agnes Assao, Diego Maurício Bravo Calderón, Alexandre García, Natália García, Magda Paula Nascimento, e outros, com quem dividi momentos de estudo e descontração.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que a minha trajetória pelo doutorado se tornasse mais prazerosa e proveitosa, meus sinceros e eternos agradecimentos!!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru - USP na pessoa da excelentíssima Diretora Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Bauru, USP pela oportunidade de fazer parte dessa instituição que é referência mundial, como funcionária e aluna, por investir no desenvolvimento de seus funcionários!!!

À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP na pessoa da Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, responsável por esta disciplina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa (2012/12458-9), concedendo recursos financeiros para a viabilização deste trabalho.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A presença de *Candida albicans* nos biofilmes microbianos aderidos na superfície interna das próteses removíveis, principalmente totais superiores, está relacionada com uma doença inflamatória no palato, conhecida como estomatite protética (EP). Assim, torna-se fundamental a realização de novos estudos sobre alternativas terapêuticas, direcionados à prótese e não somente à mucosa, que sejam simultaneamente antimicrobianas, anti-inflamatórias, não tóxicas para os tecidos bucais e que produzam menos danos à prótese que os métodos convencionais. Os fitoterápicos podem representar uma destas alternativas. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi estudar a ação fitoterápica do *Equisetum giganteum*, nas concentrações de 50, 25, 16, 8 e 4 mg/mL, sobre *C. albicans* e descartar sua ação citotóxica sobre o palato humano bem como sobre monócitos humanos.

Material e Métodos: Após coleta, obtenção e identificação de compostos por espectrometria de massas do extrato hidroalcoólico de *E. giganteum*, sua atividade antimicrobiana foi determinada pela concentração inibitória mínima em meio líquido, contra as cepas clínicas *Candida albicans* SC 5314 e *Escherichia coli* O:124, e a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Propriedades antiaderentes do extrato, sobre biofilmes de *C. albicans* induzidos sobre corpos de prova de resina acrílica, foram determinadas por imunofluorescência (LIVE/DEAD) e pela análise em microscópio de varredura confocal a laser. A atividade anti-inflamatória do fitoterápico foi averiguada através da análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por monócitos humanos estimulados por *C. albicans* e LPS, por meio da marcação fluorescente utilizando o reagente Cell Rox Deep Red®. Avaliação de citotoxicidade foi realizada in vitro com células epiteliais de palato humano e monócitos humanos, por meio do ensaio colorimétrico MTT. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e submetidos aos testes estatísticos Teste de Kruskal-Wallis; ANOVA one-Way; ANOVA two-Way, Teste de Miller; Teste de Tukey e Dunnet; Teste de Fisher, sendo $p < 0,05$ considerado significativo. **Resultados:** O estudo da composição química do extrato EtOH 70% de *E. giganteum* evidenciou a presença de compostos fenólicos derivados dos ácidos cafeico e ferúlico, heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina e kaempferol, além de estilipironas. A atividade bactericida/fungicida foi comprovada

em todas as concentrações testadas do extrato e contra todas as cepas avaliadas. Todas as concentrações do extrato resultaram em redução significativa dos biovolumes de células viáveis em relação a resina não tratada, o que indica interferência do fitoterápico na aderência de *C. albicans* à resina termopolimerizável. A atividade anti-inflamatória foi determinada pelo retorno da produção de espécies reativas de oxigênio aos níveis basais, pelos monócitos humanos ativados, quando tratados com todas as concentrações do extrato. Houve manutenção da viabilidade celular de monócitos humanos e das células epiteliais de palato humano, após contato com o fitoterápico nos períodos de 1, 12 e 24 horas. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que o fitoterápico *E. giganteum* possui propriedades: **microbicida** frente a *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, **antiaderente** para *C. albicans* sobre a superfície da resina acrílica termopolimerizável e **anti-inflamatória** sobre monócitos humanos ativados por *C. albicans*. Além disso, o fitoterápico não comprometeu a viabilidade de monócitos humanos e de células epiteliais de palato humano.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Estomatite protética, *Equisetum*

ABSTRACT

Phytotherapeutic *Equisetum giganteum* and denture stomatitis: study of antimicrobial, antiadherent and anti-inflammatory action against *Candida albicans*, and cytotoxic potential in human palatal epithelial cells

The presence of *Candida albicans* in the microbial biofilms adhered to the internal surface of the removable denture, mainly the full upper ones, is related to an inflammatory palate disease known as denture stomatitis (DS). Thus, it is essential that new studies are done about therapeutic alternatives directed to the dentures, not only to the buccal mucosa, and which are, at the same time, antimicrobial, anti-inflammatory, non-poisoning to the buccal tissues and that they produce less harm to the denture than the current methods. The phytotherapeutic (herbal) remedies may represent a good alternative. **Objectives:** The aim of this paper is to study the phytotherapeutic action of *Equisetum giganteum* in the concentrations of 50, 25, 16, 8 and 4 mg/mL on *C. albicans* and discard the cytotoxic action on the human palate, as well as on human monocytes.

Material and Methods: After collecting, obtaining and identifying the compounds by means of mass spectrometry of the hydroalcoholic extract of *E. giganteum*, its antimicrobial activity was determined by the inhibitory minimum concentration in liquid media, against clinic strains of *Candida albicans* SC 5314 and *Escherichia coli* O:124, and standard *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strains. The antiadherent, properties of the extract on biofilms of *C. albicans* over acrylic resin proof specimens were determined by immunofluorescence test (LIVE/DEAD) and by the analysis in a Confocal Laser Microscope Scanning. The anti-inflammatory activity of the phytotherapeutic (herbal) remedy was assessed through the analysis of the production of reactive oxygen species (ROS) to human monocytes stimulated by *C. albicans* and LPS, through fluorescent lighting using the reagent Cell Rox Deep Red[®]. The evaluation of cytotoxicity was done in vitro with epithelial cells of human palate and human monocytes, through colorimetric MTT assay. The results were expressed in means $\pm$ standard deviation and submitted to statistics Kruskal-Wallis Test; ANOVA Two-way, Miller Test; Tukey and Dunnet Test; Fisher Test, where

$p < 0,05$ was considered significant. **Results:** The study of the chemical composition of the extract EtOH 70% of *E. giganteum* has shown a clear presence of phenolic compounds derived from caffeic and ferulic acids, flavonoid heterosides derived from quercitin and kaempferol, in addition to estirilpirones. Its bactericidal/fungicide activity was proved in all extract concentrations tested and against all evaluated strains. All extract concentrations resulted in significant reduction of bio volumes of viable cells in relation to non-treated resin, which indicates interference of the phytotherapeutic in the adherence of *C. albicans* to the thermopolymerizable acrylic. The anti-inflammatory activity was determined by the production return of reactive oxygen specimens to basal levels, by activated human monocytes, when treated with all extract concentrations. There was cell viability of human monocytes and of human palate epithelial cells, after the contact of with the phytoterapeutic in the periods of 1, 12 and 24 hours. **Conclusion:** These results suggest that the phytotherapeutic *E. giganteum* has properties: **microbicide** in relation to *C. albicans*, *E. coli* and *S. aureus*, **antiadherent** to *C. albicans* on thermopolymerizable acrylic and **anti-inflammatory** on human monocytes activated by *C. albicans*. In addition to this, the phytotherapeutic did not compromise either human monocytes viability or human palate epithelial cells.

Key-Words: *Candida albicans*, Denture Stomatitis, *Equisetum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Procedimentos envolvidos na obtenção do Extrato EtOH 70% de *E. giganteum*48
- Figura 2** - Confeção dos corpos de prova em resina acrílica: (A) Resina termopolimerizável Lucitone 550; (B) Isolante Cel-Lac e Silicona de condensação Zetalabor; (C) Matriz acrílica; (D) Corpos de prova em silicona; (E) Posicionamento dos CP sobre o gesso e isolamento do molde com Cel-Lac; (F) Colocação da mufla em prensa hidráulica; (G) Mufla aberta após 30 minutos na prensa hidráulica e retirada dos CP de silicona; (H) Pó e acrílico proporcionados e misturados; (I; J) Deposição da resina dentro dos moldes de gesso; (L) Termopolimerizadora digital; (M) CP após demuflagem; (N) Polimento dos corpos de prova em politriz metalográfica.....58
- Figura 3** - Cromatograma analítico obtido na análise por UHPLC-PAD-MS do extrato EtOH 70% das partes aéreas de *E. giganteum*. Sistema de eluição: A (MeOH + 0,1% AF) e B (H₂O + 0,1% AF.). Gradiente linear: 5-100% de A em B em 20 min. Coluna Thermo Scientific® (50 x 2.1 mm, 1.9 µm). Forno de coluna: 25 °C. Fluxo 0,4 MI min⁻¹, λ = 254 nm. Volume de injeção: 10µL.....64
- Figura 4** - Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS do extrato EtOH 70% de *E. giganteum* analisado em modo negativo.(●) íons fragmentados.65
- Figura 5** - Estrutura dos compostos identificados no extrato EtOH 70% de *E. giganteum*67
-
-

-
-
- Figura 6** - Percentual de morte dos microrganismos após 24h na presença de diferentes concentrações do extrato do fitoterápico, ou de NaOCl 1% (controle positivo). O extrato foi utilizado nas seguintes concentrações: 50 (E50), 25 (E25), 16 (E16), 8 (E8) e 4 (E4) mg/mL. Símbolos iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (meio) após 24 horas, o qual revelou ausência de morte de microrganismos (0%). Teste de Kruskal-Wallis e teste de Miller, a partir de cinco experimentos independentes69
- Figura 7** - Produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos sanguíneos estimulados por LPS ou *C. albicans*, e sem estímulo (Meio), na presença/ausência de diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum*: 50 mg (E50), 25 mg (E25), 16 mg (E16), 8 mg (E8) e 4 mg/mL (E4), por 1 hora. Símbolos iguais representam diferença estatística ($p < 0,05$). Anova Two-way, Teste de Tukey HSD, a partir de quatro experimentos independentes70
- Figura 8** - Biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com tampão fosfato por 10 minutos (grupo controle). Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença expressiva do referido biofilme na superfície da resina, principalmente na forma filamentosa. (C) representa a sobreposição das imagens.....71
- Figura 9** - Remanescente de biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se ausência do referido biofilme na superfície da resina, constando apenas algumas células fúngicas na forma de levedura. (C) representa a sobreposição das imagens.....73
-
-

Figura 10 - Biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução aquosa de 16 mg do extrato bruto de <i>E. giganteum</i> por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença dispersa do referido biofilme na superfície da resina, predominantemente na forma filamentosa. (C) representa a sobreposição das imagens.....	75
Figura 11 - Biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução aquosa de 25 mg do extrato de <i>E. giganteum</i> por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença dispersa do referido biofilme na superfície da resina, tanto na forma de leveduras quanto na forma filamentosa. (C) representa a sobreposição das imagens.....	77
Figura 12 - Remanescente de biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução aquosa de 50 mg do extrato de <i>E. giganteum</i> por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença ínfima e dispersa do referido biofilme na superfície da resina, predominantemente na forma leveduriforme. (C) representa a sobreposição das imagens.....	79
Figura 13 - Percentual de viabilidade de monócitos na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de <i>E. giganteum</i> ou da água (Controle positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle negativo), por 1 hora. (*) $p<0,05$ quando comparado com o Controle positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de cinco experimentos independentes	83

Figura 14 - Percentual de viabilidade de monócitos humanos na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de <i>E. giganteum</i> ou da água (Controle positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle negativo), por 12 horas. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Controle positivo. Quatro experimentos independentes; Anova One-way, Teste de Fisher LSD	84
Figura 15 - Percentual de viabilidade de monócitos humanos na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de <i>E. giganteum</i> ou da água (Controle positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle negativo), por 24 horas. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Controle positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de oito experimentos independentes	84
Figura 16 - Percentual de viabilidade de células epiteliais de palato humano (CEPH) na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de <i>E. giganteum</i> ou da água (Controle positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle negativo), por 12 horas. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Controle positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de seis experimentos independentes.....	86
Figura 17 - Percentual de viabilidade de células epiteliais de palato humano (CEPH) na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de <i>E. giganteum</i> ou da água (Controle positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle negativo), por 24 horas. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Controle positivo. Três experimentos independentes; Anova One-way, Teste de Tukey HSD	86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados obtidos por UHPLC-PAD-MS (espectros no UV e íons detectados) e FIA-ESI-IT-MS/MSn (íons produtos) e identificação de compostos presentes no extrato EtOH 70% das partes aéreas de *E. giganteum*.....66
- Tabela 2** - Mediana e desvio-padrão do percentual de morte dos microrganismos *E. coli* O:124, *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* SC 5314, após 24 h de incubação com os diferentes tratamentos: extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25), 16 mg (E16), 8 mg (E8), 4 mg (E4) e respectivos controles, sem tratamento (CTRL/Meio) e tratado com Hipoclorito de Sódio 1 % (CTRL/NaOCl).....68
- Tabela 3** - Média e desvio-padrão do biovolume de células viáveis e de não viáveis, remanescentes na superfície dos corpos de prova, após os diferentes tratamentos prévios com extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25) ou a 16 mg (E16), com PBS (CTRL/PBS) e com Hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl), a partir da análise de 18 corpos de prova para cada um dos grupos.81
- Tabela 4** - Grupos com diferença estatisticamente significativa entre eles, e seus respectivos níveis de significância ($p < 0,05$). Os resultados foram obtidos por meio do teste Tukey HSD, a partir das médias do biovolume de células viáveis na superfície dos corpos de prova, após os diferentes tratamentos prévios com as soluções aquosas do extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25) ou a 16 mg (E16), com PBS (CTRL/PBS) e com Hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl) ($n=9$).....82
- Tabela 5** - Grupos com diferença estatisticamente significativa entre eles, e seus respectivos níveis de significância ($p < 0,05$). Os resultados foram obtidos por meio do teste Tukey HSD, a partir das médias do biovolume de células não viáveis na superfície dos corpos de prova, após os diferentes tratamentos prévios com as soluções aquosas do extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25) ou a 16 mg (E16), com PBS (CTRL/PBS) e com Hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl) ($n=9$).....83
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AF	Ácido Fórmico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CEPH	Células epiteliais de palato humano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm ²	Centímetro quadrado
CO ²	Dióxido de carbono
CP	Corpos de Prova
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético (ethylene diamine tetraacetic acid)
EG EtOH 70%	Extrato hidroalcólico de <i>Equisetum giganteum</i>
ELL	extração líquido-líquido
EP	Estomatite protética
<i>E. giganteum</i>	<i>Equisetum giganteum</i>
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
EtOH 70%	Etanol 70%
FIA	Análise de Injeção de Fluxo (<i>Flow Injection Analysis</i>)

FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis -Electrospray Ionization – Ion Trap – Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
g	Gramas
h	Horas
H ₂ O	Água
IT	Armadilha de íon (<i>Ion-trap</i>)
Kg	Quilograma
Kgf	Quilograma força
Kv	Quilovolts
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeo (<i>lipopolysaccharide</i>)
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MS	Espectrometria de massas
MSn	<i>Multiple-stage mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa em múltiplos estágios)
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
Nº	Número
N ₂	Nitrogênio
ng	Nanograma
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nm	Nanometro
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NO	Óxido nítrico
YEPD	Yeast Peptone Dextrose
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares

PMMA	Polimetilmetacrilato
QS	Quorum sensing
Rf	Fator de retenção
rfu	<i>Relative Fluorescence Unit</i>
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SD	Desvio Padrão
SBF	Soro bovino fetal
UHPLC-PAD-MS	<i>Ultra-high-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection</i> (Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos e detecção por Espectrometria de massas)
UHPLC-PAD-ESI-IT-MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array - Electrospray Ionization – Ion Trap – Mass Spectrometry</i> (Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos conectada a Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Eletrospray)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	ESTOMATITE PROTÉTICA	31
2.2	<i>CANDIDA ALBICANS</i> E BIOFILMES	31
2.3	CONTROLE DO BIOFILME ADERIDO EM PRÓTESES REMOVÍVEIS	35
2.4	PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: <i>Equisetum giganteum</i>	37
3	PROPOSIÇÃO	41
3.1	OBJETIVOS GERAIS	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Coleta do fitoterápico e obtenção do extrato	47
4.1.1	Triagem cromatográfica	48
4.1.2	Identificação dos compostos por UHPLC-PAD-MS e FIA- ESI-IT-MS ⁿ	48
4.2	Manipulação de <i>C. albicans</i> SC5314: obtenção da pré- cultura e padronização do inóculo	49
4.3	Manipulação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> : padronização do inóculo.....	50
4.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da diluição em caldo (D.O.)	51
4.5	Cultura de monócitos do sangue periférico e desafio com <i>C.albicans</i> , <i>E.coli</i> e LPS	52
4.5.1	Análise da produção de espécies reativas do oxigênio	53
4.6	Avaliação das propriedades antiaderente e antimicrobiana sobre resina acrílica termopolimerizável.....	53
4.6.1	Confecção dos corpos de prova	53

4.6.2	Desenvolvimento de biofilme microbiano	56
4.7	Avaliação da viabilidade celular do extrato de <i>E. giganteum</i> sobre células epiteliais de palato humano e monócitos: ensaio colorimétrico MTT	58
4.7.1	Obtenção das células epiteliais de mucosa bucal de palato humano.....	58
4.7.2	Ensaio colorimétrico MTT	59
4.8	ANÁLISE DOS RESULTADOS	60
5	RESULTADOS	61
5.1	Estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de <i>E. giganteum</i>	63
5.1.1	Análise por UHPLC-PAD-MS e FIA-ESI-IT-MS/MS ⁿ do extrato EG EtOH 70%.....	63
5.2	Atividade antimicrobiana do fitoterápico <i>E. giganteum</i> por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	68
5.3	Produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos, desafiados com LPS, <i>C. albicans</i> SC5314, na presença do extrato de <i>E. giganteum</i>	69
5.4	Aderência de biofilmes de <i>C. albicans</i> sobre a resina acrílica termopolimerizável tratada previamente com extrato de <i>E.</i> <i>giganteum</i>	71
5.5	Análise da citotoxicidade do extrato de <i>E. giganteum</i> sobre monócitos humanos, por meio do ensaio colorimétrico MTT.....	83
5.6	Análise da citotoxicidade do extrato de <i>E. giganteum</i> sobre células epiteliais de palato humano (CEPH), por meio do ensaio colorimétrico MTT	85
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICES.....	123
	ANEXOS	129

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma doença inflamatória crônica comum entre usuários de próteses removíveis (JÄRVENSIVU et al., 2004), principalmente totais superiores, acometendo a mucosa bucal que está em contato direto com o material resinoso das próteses (SHARMA; HEGDE, 2014). A doença geralmente é assintomática, podendo apresentar sintomatologia rara, como dor, halitose, prurido e queimação; e a mucosa apresenta-se eritematosa (BAILLEY; DOUGLAS, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007; NEPPELENBROEK et al., 2008).

A EP está fortemente associada com a presença de *Candida albicans* (*C. albicans*) (BUDTZ-JORGENSEN, 1979; NEPPELENBROEK et al., 2009), sendo considerada uma das formas de candidose orofaríngea. Um grande número de leveduras é geralmente encontrado na superfície interna destas próteses, a qual atua como um reservatório de microrganismos (SILVA; PARANHOS, 2002). Ainda, características do hospedeiro, como a presença de diabetes, doenças imunossupressoras, uso de antimicrobianos ou corticoides, idade avançada, entre outras, predispõem ao desenvolvimento das estomatites protéticas (SOUSTRE et al., 2004; NEPPELENBROEK et al., 2009; SKUPIEN et al., 2013).

No hospedeiro, leucócitos polimorfonucleares (PMN), monócitos e macrófagos apresentam um papel central na imunidade a *C. albicans* e espécies relacionadas. Embora pouco se saiba sobre os mecanismos protetores contra as doenças em superfícies mucosas, já foi estabelecido que a resposta imune específica e a atividade candidacida de queratinócitos e PMN desempenham um papel-chave na defesa do hospedeiro contra a infecção oral localizada por *C. albicans*. O epitélio da mucosa também possui uma importância central na defesa do hospedeiro, por ser a camada de célula primária que inicialmente encontra microrganismos ambientais (SCHALLER et al., 2004).

Atualmente, os tratamentos direcionados à EP incluem terapia antifúngica tópica, como as variadas formulações a base de nistatina, e medicação antifúngica sistêmica, como os azóis. Cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção da prótese, descontinuação do uso noturno da prótese e substituição de próteses antigas são também fundamentais para prevenir ou tratar a

EP (LOMBARDI; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993).

Os antifúngicos tópicos, apesar de serem eficientes no alívio dos sinais e sintomas da mucosa, muitas vezes não são capazes de eliminar os microrganismos presentes na base das próteses (BANTING; HILL, 2001), possibilitando um ciclo de reinfecção (QUIRYNEN et al., 1990). Além disso, a terapia antifúngica sistêmica, adotada principalmente em pacientes imunodeprimidos (PEREZOUS et al., 2005), pode produzir efeitos colaterais como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, e tem a desvantagem de não atuar sobre a prótese contaminada, levando ao insucesso da terapia (LOMBARDI; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993). Adicionalmente, o uso descontrolado de antifúngicos sistêmicos tem levado ao aparecimento de resistência microbiana (GOLDMAN et al., 2004).

Estudos de susceptibilidade revelaram que biofilmes formados por *C. albicans* podem ser até 2000 vezes mais resistentes aos medicamentos antifúngicos do que seus homólogos na forma planctônica (BAILLIE; DOUGLAS 2000; CHANDRA et al., 2001b; JABRA- RIZK et al., 2004; SHINDE et al., 2011;). Assim, mesmo que os microrganismos livres planctônicos sejam removidos pelo tratamento antifúngico, microrganismos organizados nos biofilmes permanecem, já que sobrevivem mesmo sob altas doses do medicamento (KHOT et al., 2006; SHINDE et al., 2011). A única opção nestes casos, até o momento, é a remoção ou substituição dos dispositivos colonizados por microrganismos (SHINDE et al., 2011). No caso específico das próteses removíveis, o desgaste da sua superfície interna contaminada e posterior reembasamento pode resultar em melhora clínica da EP.

Assim, considerando que a EP está associada fortemente a biofilmes de *Candida* sobre a prótese, o uso de antifúngicos locais ou sistêmicos pode não ser suficiente, se os tecidos bucais estiverem em contato repetitivamente com microrganismos aderidos na superfície interna do material resinoso da prótese. Por isso, o tratamento pode ser mais eficaz se direcionado à prótese, e não somente aos tecidos bucais (WEBB et al., 1998), como por exemplo a adoção de métodos que reduzam ou, preferencialmente, eliminem os microrganismos das superfícies das próteses, sobretudo as espécies *Candida*.

A eficácia do uso da irradiação por micro-ondas no controle do biofilme sobre a prótese foi comprovada (NEPPELENBROEK et al., 2008), porém ainda não há um protocolo seguro para sua utilização, além de causar danos à prótese, como porosidades (NOVAIS et al., 2009). A limpeza em soluções de hipoclorito, enzimas e

perboratos pode causar deterioração superficial e alteração na dureza e rugosidade, favorecendo ainda mais o acúmulo de biofilme (JIN et al., 2005; MACHADO et al., 2012). Dessa forma, torna-se interessante a busca por métodos alternativos, como os fitoterápicos, que atuem como antimicrobianos e simultaneamente não danifiquem os tecidos e/ou as superfícies das próteses.

Produtos naturais têm provado ser uma alternativa para substituir substâncias químicas sintéticas, e o interesse em plantas medicinais como uma fonte de agentes antimicrobianos tem crescido dramaticamente. Uma ampla variedade de extratos de plantas tem apresentado atividade antifúngica contra *C. albicans* (PEREIRA et al., 2011) e bactericida contra microrganismos do biofilme da placa dentobacteriana, prevenindo a formação do biofilme dental (ALVES et al., 2009). Neste contexto, estas plantas medicinais poderiam desempenhar um papel importante no tratamento da EP (CASAROTO; LARA, 2010).

O gênero *Equisetum*, pertencente a família Equisetaceae, é constituído na atualidade por 15 espécies conhecidas vulgarmente como cavalinhas. *Equisetum arvense* é uma pteridófita bem conhecida e divulgada, distribuída no hemisfério norte; seus caules estéreis são usados como medicamentos em diversos países, constituindo o “Equiseti herba” das Farmacopéias Europeias, tendo efeitos diurético, antioxidante, relaxante vascular e anti-inflamatório (MARTINS et al., 2004).

O óleo essencial de *E. arvense* exibe atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e micobactérias. Já a espécie *giganteum* é nativa do cerrado da América do Sul e Central (RICCO et al., 2011), e os estudos realizados sobre esta espécie relacionam-se principalmente à análise botânica e taxonômica, com alguns relacionados a sua biomecânica. Já os estudos fitoquímicos são escassos e centrados principalmente na determinação de compostos inorgânicos, fundamentalmente sílica e ácido silícico e, em menor escala, flavonoides e derivados hidroxicinâmicos e oleorresinas (SPATZ; KÖHLER; SPECK, 1998; CURRIE; PERRY, 2009).

Um estudo realizado com nove plantas medicinais peruanas, incluindo o *E. giganteum*, constatou sua atividade antimicrobiana, através do ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) contra os seguintes microrganismos: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus*

epidermidis ATCC 12228, e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (KLOUCEK et al., 2005).

A descoberta de novos componentes antimicrobianos é de grande relevância, particularmente para a Odontologia, já que infecções da cavidade bucal, de origem bacteriana e fúngica, são problemas relativamente comuns, resultando em doenças inflamatórias crônicas como, por exemplo, a estomatite protética associada a *Candida*. Levando-se em conta o aumento percentual da população idosa e que a EP acomete frequentemente idosos usuários de prótese total superior, torna-se fundamental a realização de novos estudos sobre alternativas terapêuticas para a EP, que sejam simultaneamente antimicrobianas, anti-inflamatórias e não tóxicas para os tecidos bucais, visando a melhora da qualidade de vida desta população idosa.

2 Síntese bibliográfica

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA

A estomatite protética (EP) é uma doença comum, que afeta principalmente usuários de próteses totais superiores, caracterizada por inflamação e eritema das áreas da mucosa bucal em íntimo contato com a base ou superfície interna (resina termopolimerizável) das próteses. Estudos epidemiológicos relatam que a prevalência de EP entre usuários de próteses totais varia de 15 a 70% (GENDREAU; LOEWY, 2011; MARTORI et al., 2013). A EP foi classificada clinicamente por Newton em três tipos, de acordo com o grau de severidade: Tipo I (Eritematosa localizada), Tipo II (Eritematosa difusa) e Tipo III (Hiperplasia granular) (NEWTON, 1962).

A etiologia da EP é complexa e multifatorial. Fatores predisponentes incluem trauma da mucosa por próteses mal adaptadas, falta de higiene adequada bucal e da prótese, xerostomia, consumo excessivo de carboidratos (glicose e sacarose), uso contínuo da prótese, doenças crônicas, antibioticoterapia e sistema imune comprometido (NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998; NEPPELENBROEK et al., 2009). Apesar da etiologia complexa, o fungo *C. albicans* tem sido considerado o principal microrganismo relacionado à patogênese da doença, sendo comumente isolado de pacientes com EP (MARTORI et al., 2013; SHARMA; HEGDE, 2014). Com o uso contínuo da prótese, o espaço entre a mucosa e a superfície da prótese fornece um ambiente propício para o abrigo de patógenos potenciais, favorecendo a colonização e a proliferação desses microrganismos (SHARMA; HEGDE, 2014).

2.2 *CANDIDA ALBICANS* E BIOFILMES

Em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis, fungos do gênero *Candida* são encontrados como organismos comensais, colonizando superfícies mucosas da cavidade bucal, vagina e trato gastrointestinal, não causando danos aparentes nem inflamação nos tecidos adjacentes (ELAHI et al., 2000; AKPAN;

MORGAN, 2002). Contudo, sob certas condições predisponentes, como imunodepressão, o fungo pode multiplicar-se, tornando-se patogênico, e penetrar nos tecidos do hospedeiro causando inflamação e destruição tecidual, alternando-se quanto a sua morfologia, de levedura para micélio ou hifa (ROGERS; BALISH, 1980; BUNETEL; BONNAURE-MALLET, 1996; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; SHARMA; HEGDE, 2014). A transição dessas leveduras de comensal inócuo a parasita depende tanto de fatores de virulência do microrganismo como da susceptibilidade do hospedeiro (JORGE; BATISTA; REGO, 2000).

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas e 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; AKPAN; MORGAN, 2002; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003).

Uma capacidade inerente a *C. albicans* é a formação de uma estrutura particular denominada de biofilmes, os quais consistem em comunidades de microrganismos aderidos às superfícies e envoltos por uma matriz formada por substância polimérica extracelular produzida por eles mesmos (HAWSER; DOUGLAS, 1994; TUNNET; GORMAN; PATRICK, 1996; DONLAN, 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002;). Portanto, *C. albicans* possui a habilidade para aderir e colonizar várias superfícies como, por exemplo, cateteres, válvulas cardíacas artificiais, aparelhos ortodônticos e resinas acrílicas das próteses removíveis (HE et al., 2006; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; COULTHWAITE; VERRAN, 2007; SHINDE et al., 2011).

A adesão desse fungo às superfícies é um evento primário e necessário para a sua colonização, envolvendo alguns componentes da parede celular do fungo como manose, manoproteínas, sacarinas e adesinas. Após a adesão à superfície, inicia-se o processo de formação do biofilme, o qual é variável e depende da cepa clínica de *Candida* spp. (NIKAWA et al., 1991; CANNON; CHAFFIN, 2001; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013). A patogenicidade do fungo do gênero *Candida* tem sido atribuída a sua capacidade de aderir e formar biofilmes, bem como de liberar enzimas hidrolíticas, como as proteases (NAGLIK et al., 2003; NAGLIK et al., 2008; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013).

Aderidas às superfícies, as leveduras de *Candida* formam rapidamente complexos biofilmes associados a bactérias e inerentemente resistentes aos

tratamentos convencionais com antifúngicos. Tais biofilmes, quando em contato com os tecidos do hospedeiro, resultam em uma reação inflamatória, como observado na mucosa bucal, nos casos de EP (JENKINSON; LAMONT, 2005; COCO et al, 2008; PELLIZZARO et al., 2012).

De um modo geral, os biofilmes são a forma mais comum de crescimento microbiano na natureza; estima-se que até 80% de todos os microrganismos no ambiente existam em comunidades de biofilmes aderidos às superfícies, e mais de 65% das infecções microbianas em humanos envolvam biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006). Por esta razão, os biofilmes apresentam importante relevância clínica, especialmente devido à alta resistência a antibióticos (CHANDRA et al., 2001). Microrganismos, quando organizados em biofilmes, estão mais protegidos das células imunes do hospedeiro e tornam-se mais resistentes aos antimicrobianos, quando comparados aos seus homólogos no estado planctônico (LEWIS 2001).

Na cavidade bucal, estes fungos têm sido isolados da superfície dos dentes e de material restaurador, língua, mucosas palatal e jugal e, sobretudo, superfícies resinosas de próteses removíveis (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; COULTHWAIT; VERRAN, 2007; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013). Em comparação com outros materiais dentários, tem sido sugerido que *C. albicans* adere e forma biofilmes preferencialmente em polimetilmetacrilato (PMMA), o principal componente das resinas acrílicas que compõem as próteses removíveis (RAMAGE et al., 2012).

O processo de formação do biofilme de *C. albicans* em lâminas de PMMA ocorre em basicamente três fases distintas: a) fase inicial (0 a 11 horas); b) fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas) e c) fase de maturação (aproximadamente 38 a 72 horas). Inicialmente, as células leveduriformes de *C. albicans* se aderem à superfície da lâmina de PMMA, formando microcolônias. Nas primeiras 11 horas, as comunidades de *C. albicans* aparecem como uma camada de células, devido ao crescimento e agregação das colônias. Já o desenvolvimento da fase intermediária é caracterizado pela emergência e predominância de substância não celular (polimérica), a qual se assemelha a uma “névoa” que forma um filme e cobre as microcolônias do fungo. Durante a fase de maturação, a quantidade de substância polimérica extracelular aumenta com o tempo de incubação, e as comunidades de *C. albicans* são completamente cobertas por essa substância

(CHANDRA et al., 2001b).

Inicialmente, a aderência microbiana às superfícies de PMMA pode ser atribuída a interações não específicas (interações eletroestáticas e forças físico-químicas) entre as proteínas de superfície das células de *Candida* e superfícies inertes ou tecidos bucais, conhecidas como hidrofobicidade da superfície da parede celular (CSH – *cell surface hydrophobicity*). A CSH é caracterizada pela presença de proteínas hidrofóbicas que estão embebidas na matriz extracelular de *Candida*. Subsequentemente, a aderência ocorre por meio de interações específicas entre receptores da película adquirida (que cobre tecidos bucais e a prótese, como por exemplo as mucinas) e ligantes presentes na superfície dos fungos *Candida*, como as adesinas. Além disso, propriedades do PMMA, como a rugosidade de superfície e a energia livre de superfície, podem contribuir para a taxa de colonização e relacionar-se com a maturação de biofilmes microbianos, em especial por *C. albicans*, em superfícies bucais (BUSSCHER; COWAN; VAN DER MEI, 1992; VASILAS et al., 1992; QUIRYNEN; BOLLEN, 1995; SIPAHI; ANIL; BAYRAMLI, 2001; COMBE; OWEN; HODGES, 2004).

Quando a resina acrílica apresenta rugosidade superficial acima de 0,2 μm , sua superfície torna-se passível de colonização (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997), pois o crescimento em forma micelial de *Candida* spp. permite que esse fungo se desenvolva e se aloje no interior das ranhuras formadas, onde estará livre de forças externas de remoção, como o efeito autolimpante da saliva e da escovação, proporcionando um reservatório de fungos (SAMARANAYAKE; MCCOURTIE; MACFARLANE, 1980). Além disso, as superfícies rugosas proporcionam colonização e maturação mais velozes da placa microbiana sobre a prótese (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

A rugosidade superficial é extremamente crítica, principalmente, para as próteses removíveis totais, visto que, diferente das superfícies externas vestibular e lingual, as quais devem ser polidas, a sua superfície interna ou área basal convencionalmente sofre apenas um leve polimento, a fim de melhorar a retenção da prótese ao palato (PHILLIPS, 1986; NEPELLENBROEK et al., 2009). Dessa maneira, essa região deve apresentar valores de rugosidade superficial bem superiores a 0,2 μm , tornando-se passível de adesão microbiana (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997).

Como agravante, a abrasão provocada pela higienização através da escova

dental e dos ajustes clínicos com fresas, bem como a deterioração do acrílico por substâncias como a água e soluções higienizadoras, com o decorrer do tempo, são fatores que proporcionam a formação de irregularidades na resina acrílica de próteses totais, compatíveis com o diâmetro dos microrganismos, favorecendo o acúmulo e a penetração desses patógenos no interior da resina (DAVENPORT, 1972; VAN REENEN, 1973). Estudos têm revelado que alguns microrganismos podem penetrar até 3 mm, na superfície interna da prótese (THEILADE; BUDTZ-JORGENSEN, 1980; CATALAN; HERRERA; MARTINEZ, 1987). Desse modo, os cuidados de higienização devem ser cuidadosamente realizados sobre as superfícies das próteses removíveis (CHAU et al., 1995).

2.3 CONTROLE DO BIOFILME ADERIDO ÀS PRÓTESES REMOVÍVEIS

Vários estudos demonstraram que as colônias de *Candida* spp. são mais frequentemente isoladas da superfície interna das próteses removíveis, principalmente totais, do que da mucosa correspondente (DAVENPORT, 1970; ARENDORF; WALKER, 1979; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998; BANTING; HILL, 2001). Isto sugere que o tratamento para a EP deve ser direcionado primariamente à prótese (DAVENPORT, 1970), uma vez que as colônias de *Candida* spp. presentes nas superfícies de resina acrílica podem causar reinfecção da mucosa do paciente (DAVENPORT, 1972).

Assim, protocolos de tratamento para EP incluem desgaste com reembasamento da superfície interna da prótese, uso de substâncias químicas tais como clorexidina e hipoclorito de sódio, higiene eficiente da prótese e sua remoção durante a noite. A associação desses procedimentos com a aplicação tópica de agentes antifúngicos sobre as áreas afetadas e sobre a prótese é bem relevante. As drogas mais comumente utilizadas são os compostos imidazólicos (miconazol), derivados poliênicos (nistatina) e anfotericina B (CASAROTO; LARA, 2010).

A utilização de antifúngicos tópicos tais como a nistatina e a anfotericina B geralmente é efetiva inicialmente, porém, a medicação pode produzir efeitos colaterais em alguns pacientes e, quando a terapia é interrompida, a doença pode reaparecer (WEBB et al., 1998). Além disso, biofilmes de *Candida* sobre a superfície interna das próteses são pouco suscetíveis aos antifúngicos comumente utilizados, e

a resistência aos antifúngicos aumenta com a maturação do biofilme (DALLEAU et al., 2008). A expressão do gene FKS1p e consequente síntese de glucano da matriz por *C. albicans* têm sido consideradas uma das causas da resistência de biofilmes frente a drogas azólicas como o fluconazol (NETT et al., 2010; NETT et al., 2010).

O uso de agentes antissépticos e desinfetantes desempenha um papel importante no controle do biofilme microbiano, como tem sido demonstrado com a imersão de próteses removíveis totais em hipoclorito de sódio durante a noite (BRADEN; WRIGHT; PARKER, 1995; PAVARINA et al., 2003). Ainda, a irradiação de micro-ondas sobre próteses contaminadas, em um tempo e potência especificados, revelou ser bactericida e candidacida (ROHRER; BULARD, 1985; THOMAS; WEBB, 1995; WEBB et al., 1998; NEPPELENBROEK et al., 2008). Idealmente, a remoção do biofilme somada à redução da viabilidade dos microrganismos que o formam é sempre pretendida no controle do biofilme sob a prótese total removível (MEILLER et al., 1999; CHEN; STEWART, 2000; LIAQAT; SABRI, 2008).

Desse modo, para o tratamento da EP torna-se fundamental a adoção de métodos que reduzam ou, preferencialmente, eliminem os microrganismos das superfícies das próteses, sobretudo as espécies *Candida*. Controlar a formação do biofilme microbiano na prótese é imprescindível para a manutenção da saúde dos seus usuários. Isso deve ser promovido por meio de técnicas diárias de higienização e desinfecção das mesmas, realizadas pelo próprio paciente, orientado sempre pelo cirurgião-dentista (BUDTZ-JORGENSEN, 1979). Desinfetantes de próteses removíveis devem ser fáceis de usar, bactericidas, fungicidas, atóxicos, não prejudiciais à estrutura da prótese e removedores efetivos de depósitos orgânicos e inorgânicos (ABELSON, 1985).

Como já abordado, os desinfetantes químicos, sobre próteses removíveis, são considerados métodos eficazes para a prevenção da formação do biofilme e da invasão de *C. albicans* na resina (DAVENPORT, WILSON; SPENCE, 1986; HARRISON, BASKER; SMITH, 1989; NIKAWA et al., 1999), porém o seu uso diário pode prejudicar as propriedades físicas das bases acrílicas da prótese, bem como resultar em corrosão de metais (BUDTZ-JORGENSEN, 1979; GOLL; SMITH, 1983; HARRISON et al., 1989; NIKAWA et al., 1994).

Plantas medicinais podem constituir uma alternativa para substâncias químicas sintéticas, por apresentarem agentes antimicrobianos. Por exemplo,

fitoterápicos têm sido eficazes contra microrganismos do biofilme dental, auxiliando na prevenção da sua formação (ALVES et al., 2009). Como vários extratos de plantas têm demonstrado ação antifúngica contra *C. albicans*, possivelmente tais plantas medicinais desempenham também um papel importante no tratamento da EP (CASAROTO; LARA, 2010).

2.4 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: *Equisetum giganteum*

Inúmeras plantas constituem matéria-prima para produtos farmacêuticos, em função de sua diversidade de metabólitos secundários (fitoquímicos), muitos deles com propriedades benéficas a saúde, que incluem atividades antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, preventiva contra o câncer, hepatoprotetora, antitrombótica, anti-hemorragica, vasodilatadora, bem como estimulante da cicatrização de feridas (VASCONCELOS et al., 2003; FAHEY et al., 2001; SOOBRAATTEE et al., 2005). No Brasil, comunidades locais usam plantas e seus extratos para diferentes propósitos, considerando que há grande disponibilidade destas plantas e o custo é baixo para a preparação dos produtos correspondentes (SOUZA; FELFILI, 2006).

A descoberta de novos componentes fitoterápicos antimicrobianos é de grande relevância, particularmente para a Odontologia, já que muitas doenças infecciosas ou relacionadas com microrganismos na cavidade bucal dependem da formação e manutenção de biofilmes microbianos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; BONHOMME; D'ENFERT, 2013). A formação de biofilmes é um processo dinâmico mediado por inúmeros mecanismos inter-relacionados, tais como adesão, síntese de matriz extracelular polimérica, motilidade e *quorum sensing* (QS) (SIMÕES et al., 2007; LANDINI et al., 2010).

O *quorum sensing* é uma forma de comunicação intercelular entre os microrganismos, por meio de moléculas de sinalização extracelulares, objetivando coordenar comportamentos dentro da comunidade, como a formação de biofilme e a expressão de fatores de virulência. Interferências no QS podem afetar o desenvolvimento do biofilme e a susceptibilidade aos antimicrobianos (VERMA; MIYASHIRO, 2013; BORGES et al., 2014). Este mecanismo de QS está relacionado

com a resistência do biofilme a vários antimicrobianos, bem como às células e às moléculas do sistema imune do hospedeiro. Por esta razão, tais moléculas de sinalização têm sido alvos para a ação de drogas microbicidas (KUHN et al., 2002; ZHU et al., 2011).

Nos últimos anos, alguns estudos publicaram compostos naturais com capacidade para inibir o QS, como as ervas daninhas, alimentos e extratos de plantas medicinais (GAO et al., 2003; VATTEM et al., 2007; ZHU; SUN, 2008; KHAN et al., 2009).

O gênero *Equisetum*, pertencente a família Equisetaceae, é constituído na atualidade por 15 espécies conhecidas vulgarmente como cavalinhas. Tais plantas têm demonstrado propriedades antimicrobianas. Espécies de *Equisetum*, principalmente *E. hymale*, *E. myriochaetum* e *E. laevigatum*, são tradicionalmente usadas em tratamentos de doenças renais e diabetes, visto que contêm constituintes hipoglicêmicos (WRIGHT et al., 2007; ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005).

Especificamente, *Equisetum giganteum* (*E. giganteum*), conhecido como “cola de caballo”, “limpia plata” e “yerba del platero”, é uma espécie rizomatosa, herbácea, perene, de 1 a 2 m de altura, de caules fistulosos, espessos e ramificados. Apresenta folhas escamiformes negras dispostas em forma de bainha, e esporófitos bem notáveis localizados nas extremidades dos ramos dos caules. É uma espécie nativa da América do Sul e Central (RICCO et al., 2011), sendo muito encontrado no cerrado da região de Bauru.

Os estudos realizados sobre esta espécie relacionam-se principalmente a análise botânica e taxonômica, com alguns relacionados a sua biomecânica. Já os estudos fitoquímicos são escassos e centrados principalmente na determinação de compostos inorgânicos, fundamentalmente sílica e ácido silícico e, em menor escala, flavonoides e derivados hidroxicinâmicos e oleorresinas (SPATZ; KÖHLER; SPECK, 1998; CURRIE; PERRY, 2009).

O kaempferol, um flavonoide encontrado em muitos vegetais, incluindo o *Equisetum* spp., possui a capacidade de reduzir os riscos de desenvolver câncer e doenças cardiovasculares. Ainda, o kaempferol apresenta outras atividades farmacológicas como as ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, cardioprotetora, neuroprotetora, hipoglicêmico, ansiolítica, analgésica, dentre outras (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011).

E. giganteum é tradicionalmente empregado como diurético, através do uso

oral de seus extratos aquosos, em especial no tratamento de litíase renal. Na medicina tradicional, esta planta tem sido usada como adstringente e para o tratamento de diversos processos dermatológicos. Em menor escala, é empregada como antidiarréico, bem como no tratamento de enfermidades hepáticas, de enfermidades gástricas, de hemorragias internas e de infecções no trato respiratório (DESMARCHELIER; SCHAUS, 2000).

Em face dessas considerações e da necessidade do desenvolvimento de métodos eficazes de ação local que combatam e/ou previnam os biofilmes ricos em *C. albicans*, com enfoque na prevenção e tratamento da EP, o presente trabalho avaliou o potencial antimicrobiano e anti-inflamatório do fitoterápico *E. giganteum* sobre *C. albicans*, assim como seu efeito sobre a aderência de *C. albicans* na superfície de resina acrílica termopolimerizável. Além disso, avaliamos o potencial citotóxico das mesmas frações sobre células epiteliais de palato e de monócitos humanos, já que acreditamos que, após estudos complementares, este fitoterápico poderá ser uma alternativa terapêutica/preventiva tópica a ser aplicada ou incorporada na superfície interna de próteses removíveis, em especial as totais superiores.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar o potencial antimicrobiano e anti-inflamatório do fitoterápico *E. giganteum* sobre *C. albicans*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderente do fitoterápico *E. giganteum* sobre biofilme de *C. albicans* desenvolvido na superfície de resina acrílica termopolimerizável;
- Avaliar o potencial citotóxico do fitoterápico *E. giganteum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de *E. giganteum*;
 - Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico de *E. giganteum* sobre *C. albicans*, por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da diluição em caldo (D.O.);
 - Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcólico de *E. giganteum* sobre *C. albicans*, em monócitos humanos in vitro, por meio da análise da sua produção de espécies reativas do oxigênio;
 - Avaliar a propriedade antimicrobiana e antiaderente do extrato hidroalcólico de *E. giganteum* em biofilmes de *C. albicans* induzidos sobre a superfície de corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, por meio de análise microscópica de varredura do tipo confocal a laser;
 - Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcólico de *E. giganteum* sobre células epiteliais de palato humano e sobre monócitos humanos in vitro, por meio de ensaio colorimétrico a base de MTT.
-

4 *Material e Métodos*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do fitoterápico e obtenção do extrato

A coleta do *E. giganteum* foi realizada no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da rodovia Comandante João Ribeiro de Barros - SP 225 (22°20'30" S e 49°00'30" W). Foram coletados 3,7 kg de material fresco de *E. giganteum* para o estudo fitoquímico. Ramos férteis da planta foram utilizados para confecção de exsiccatas (identificação e herborização) e incluídos no acervo do Herbário da Unesp de Bauru (UNBA 5795). O material coletado foi processado e analisado fitoquimicamente no Laboratório de Química de Produtos Naturais – UNESP/BAURU sob coordenação da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal.

As partes aéreas de *E. giganteum* foram secas em estufa a 45°C e trituradas em liquidificador, e em seguida, em moinho de facas para obtenção de um pó fino, a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos. A extração foi feita por percolação do pó com solvente orgânico etanol 70% (EtOH) (PRISTA, 1995). O material moído (1,468 kg) foi previamente intumescido com 2L de EtOH 70% (v/v) durante duas horas em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura do pó e solvente. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal). A vazão do percolador ficou entre 1-2,0 mL.min⁻¹.Kg de material vegetal. Após a extração, a solução foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 50°C. O extrato foi submetido à extração líquido-líquido (ELL) com diferentes solventes orgânicos contra a fase aquosa. Foram feitas partições com diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. A Figura 1 exemplifica as etapas realizadas para obtenção do extrato padronizado EtOH 70% por percolação.

Figura 1. Procedimentos envolvidos na obtenção do Extrato EtOH 70% de *E. giganteum*. (EG EtOH 70%).

4.1.1 Triagem cromatográfica

O extrato hidroalcoólico obtido por percolação foram monitorados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para as análises do perfil cromatográfico (“finger print”) do extrato hidroalcoólico foi realizada análise em cromatógrafo Jasco[®], com bomba quaternária com forno de coluna e detector PAD, em coluna Phenomenex[®] Luna C18 100A (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm). Como fase móvel, utilizaram-se os solventes Água (H₂O) + Ácido Fórmico (AF) 0,1% (**A**) e Metanol (MeOH) + AF 0,1% (**B**), grau CLAE. Um gradiente exploratório de 5-100 % de **B** em **A**, em 120 minutos, foi realizado a fim de se ter um perfil amplo da amostra. O volume de amostra injetado foi de 40 µL, a temperatura de 25°C, sob fluxo 1,0 mL¹. As análises foram feitas sob monitoramento a 254 nm de comprimento de onda.

4.1.2 Identificação dos compostos por UHPLC-PAD-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ

Atualmente, métodos de espectrometria de massas (MS) estão suficientemente desenvolvidos para tornar possível a identificação estrutural, pelo menos em parte, de substâncias como flavonoides heterosídeos. Apesar de as técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) serem preferidas para completa elucidação estrutural, as técnicas de MS podem contribuir de forma significativa já que é possível analisar amostras com quantidades muito menores de compostos

isolados.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo LCQ FLEET (Thermo scientific®), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA-*Flow Injection Analysis*). A amostra foi analisada no modo de ionização por eletrospray (ESI-*Electrospray ionization*) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS2, MS3) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -20 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 275 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 12 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos. Para os experimentos de UHPLC-PAD-MS (*Ultra-high-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection*) o equipamento foi acoplado a um cromatógrafo modelo Accela High Speed LC (Thermo scientific®). O sistema de eluição usado foi: A (MeOH + 0,1% AF) e B (H₂O + 0,1% AF). Gradiente linear: 5-100% de A em B em 20 min. Coluna Thermo Scientific® (50 x 2.1 mm, 1.9 µm). Forno de coluna: 25 °C. Fluxo 0,4 mL.min⁻¹, λ=254 nm. Volume de injeção: 10µL.

4.2 Manipulação de *C. albicans* SC5314: obtenção da pré-cultura e padronização do inóculo

Em todos os experimentos, foi utilizada a cepa do fungo *C. albicans* selvagem SC5314 e manipulada nas dependências do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), da FOB – USP. O preparo do inóculo foi feito da seguinte maneira: as células mantidas a -80°C em solução contendo 20% de glicerol foram semeadas em placas contendo

meio de cultura YEPD (por litro: 10g yeast extract, 10g peptone, 20g dextrose, 20g Agar - Acumedia[®]) incubadas a 30°C durante 36 horas em estufa bacteriológica (Fanem[®]).

Uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida na incubadora (Nova Ética[®]) a 30°C, sob agitação 180 rpm *overnight* (aproximadamente 16 horas). Foram retirados 5 mL da cultura e colocados em tubos cônicos de 15 mL para centrifugação, a 4000 rpm por 5 minutos; em seguida, o sobrenadante foi descartado.

A purificação das células foi feita através de lavagem do *pellet* com PBS (5 mL), e homogeneização em vórtex seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

O *pellet* final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspensa em 1 mL de PBS e diluído a 1:10000. Uma alíquota da diluição (10 µL) foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de leveduras em microscópio óptico comum. Depois de obtida a concentração final da suspensão, esta foi ressuspensa em PBS para aquisição de inóculo em concentração de 1×10^7 células/mL.

4.3 Manipulação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*: padronização do inóculo

No ensaio da atividade antimicrobiana, para fins comparativos, foram utilizadas também cepas de *Escherichia coli* (*E. Coli*) 01124, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Mario Julio Ávila-Campos, do Laboratório de Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo, e cepas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538, gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia – UNESP - Araraquara. Tais cepas foram manipuladas nas dependências do CIP, da FOB – USP.

Para o preparo do inóculo, as células mantidas a -80°C em solução contendo 20% de glicerol foram semeadas em placas contendo meio de cultura BHI ágar (*Brain Heart Infusion*, DIFCO[®]), e incubadas a 37°C durante 24 horas em estufa

bacteriológica (Fanem®). Uma única colônia de *E.coli/S.aureus* foi removida e ressuspensa em 50 mL de meio BHI caldo e mantida em estufa bacteriológica a 37°C *overnight*. A suspensão obtida foi centrifugada e o sobrenadante descartado e substituído por tampão fosfato pH 7,0. A concentração do inóculo foi padronizada, comparando a turbidez do inóculo com o padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro (600 nm). Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (MCFARLAND, 1907). O inóculo foi ajustado para 1×10^7 céls/mL.

4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da diluição em caldo (D.O.)

A atividade antimicrobiana do fitoterápico *E. giganteum* contra cepas clínicas: *C. albicans* SC 5314 e *E. coli* O:124, e a cepa padrão *S. aureus* ATCC 6538 foi determinada pelo método de diluição em caldo, usando placas de cultura de 96 poços e cinco concentrações do extrato (50, 25, 16, 8 e 4 mg/mL). Cada poço foi inoculado com 5 µL das suspensões bacterianas e fúngica na densidade de 1×10^7 céls/mL e incubadas a 37°C por 24 horas. Poços continham somente o inóculo fúngico ou bacteriano (1×10^7 céls/mL), os quais foram considerados controles internos negativos (Meio); enquanto poços continham o inóculo (fungo ou bactéria) com hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl), os quais foram considerados controles internos positivos. O crescimento de microrganismos foi observado pela turbidez determinada através do espectrofotômetro (Synergy Mx Monochromator-Based Biotek®) a 580-600 nm.

Devido ao extrato modificar o meio, foi necessário realizar duas leituras, uma leitura inicial (t_0), e uma leitura final (t_{final}) após 24 horas de inoculação. Isto possibilitou uma comparação entre as leituras, quanto à turbidez no espectrofotômetro, antes e depois da incubação, a fim de detectar os poços com crescimento microbiano.

A análise da CIM foi realizada calculando-se o percentual de viabilidade dos microrganismos a partir das densidades ópticas (DO) obtidas nas amostras (controles internos positivos e extratos) comparadas àquelas do controle interno

negativo (100% de viabilidade).

Após isso calculava-se o percentual de morte, considerando o controle interno positivo (NaOCl) como 100% de morte (pois apresentavam valores de DO negativos) e subtraindo o percentual de viabilidade dos extratos de 100%. Todo o experimento foi realizado em triplicatas.

4.5 Cultura de monócitos do sangue periférico e desafio com *C.albicans*, *E.coli* e LPS

Para cultivo dos monócitos in vitro, foi obtido sangue de cinco voluntários. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, com número de processo segundo a Plataforma Brasil CAAE: 06706412.2.0000.5417. Assim, foram coletados 30 mL de sangue em tubo Vacutainer® (BD) com heparina sódica, sendo 6 mL acrescentados em 4 tubos (15 mL) contendo 5 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Company®), que foram centrifugados a 400xg por 25 minutos, 24°C (9 de aceleração e 5 de *brake*). O halo de células foi coletado em um tubo de 15 mL, homogeneizado e centrifugado a 600xg por 10 minutos, 21°C (2 de aceleração e 2 de *brake*). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 9 mL de RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) incompleto. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de RPMI completo (10% SBF e 1% penicilina/estreptomicina). Para contagem celular em câmara de Neubauer, 25 µL das células foram misturados em 225 µL de vermelho neutro a 0,05% em um tubo de vidro sem tampa e deixado na estufa a 37°C por 15 minutos. A concentração foi ajustada para 2×10^5 céls/mL. Foi plaqueado 200 µL de RPMI completo em cada poço da placa de 96 poços e esta foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C (Ultrasafe®) por duas horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços lavados 2 vezes com RPMI simples para retirar células não aderentes (linfócitos).

Tais monócitos obtidos do sangue humano foram mantidos por 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂ (Ultrasafe®), na presença ou ausência do extrato sob diferentes concentrações e posteriormente foram estimulados com *C.albicans*

SC 5314 morta pelo calor, em autoclave vertical AV Plus Phoenix Luferco[®], a 120°C por 30 min, na proporção de 5 monócitos para 1 levedura (5:1), assim como na presença de 5 µg/mL LPS de *E. coli* O26:B6 (Sigma-Aldrich Company[®]) (controle interno positivo), e na ausência de estímulo, somente com meio de cultura (controle interno negativo), por 3 horas (OLAS et al., 2005).

4.5.1 Análise da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS)

Após o desafio de 3 horas, as placas foram retiradas da estufa para realização do protocolo de análise da produção de espécies reativas de oxigênio. Os poços foram lavados 2 vezes com tampão fosfato (PBS) para remoção dos estímulos e adicionado 190 µL de RPMI completo (10% SBF e 1% penicilina/estreptomicina) em cada poço e 10µL do reagente Deep Rox (5µM) e a placa foi mantida por 30 minutos em estufa 5% de CO₂ a 37°C (Ultrasafe[®]), conforme orientações do fabricante. Após esse período, a placa foi retirada da estufa e os poços foram lavados 2 vezes em PBS e adicionados 200µL de PBS em cada poço. A leitura foi realizada em fluorímetro (Synergy Mx Monochromator-Based Biotek[®]) a 640/665 nm. O reagente Cell Rox Deep Red é uma sonda fluorogênica, que no seu estado reduzido não é fluorescente. Na presença de espécies reativas de oxigênio, este sofre oxidação, apresentando fluorescência próxima do infravermelho, verificada através dos níveis de unidade relativa de fluorescência (rfu - *Relative Fluorescence Unit*), que representa uma medição direta dos níveis de produção de ROS em células vivas.

4.6 Avaliação das propriedades antiaderente e antimicrobiana sobre resina acrílica termopolimerizável

4.6.1 Confeção dos corpos de prova

Para esta avaliação, 90 corpos de prova de resina termopolimerizável foram confeccionados, os quais foram inicialmente obtidos a partir de padrões de silicone por condensação, de uso laboratorial (Zetalabor – Zhermack Technical[®]). Esses padrões foram confeccionados a partir de uma matriz acrílica, de forma retangular

medindo 2,5 x 2,0 x 0,5 cm, a qual foi preenchida com silicona Zetalabor e prensada entre duas placas de vidro (JON Com. de produtos odontológicos Ltda[®]) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. e Ind. Farmacêutica Ltda[®]), sob peso de 5 kg, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, os padrões de silicone foram removidos da matriz e os excessos foram cortados com auxílio de uma lâmina de estilete. Após, os padrões foram incluídos em muflas de latão polido com pino n° 6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. Ltda[®]), anteriormente isoladas com vaselina sólida. Em seguida, as muflas metálicas foram preenchidas com gesso pedra tipo III (Vigodent S/A Ind. e Com.[®]) manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand Comercial[®]) com espátula para gesso (Indusbello Ind. de Instr. Odontológicos[®]), sob vibração.

Após a polimerização, os padrões de silicone foram colocados sobre o gesso e uma nova camada deste foi colocada entre eles, a fim de fixá-los na mufla. Após o tempo de polimerização da segunda camada, foi aplicada vaselina sólida em toda a superfície. A contra-mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e, posteriormente, foi posicionada e devidamente preenchida com gesso pedra tipo III, conforme condições técnicas descritas anteriormente.

As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos Médicos Odont. Acess. Ltda[®]) com 0,5 Kgf de pressão, por uma hora, e em seguida, foram abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas. Para prensagem, foi utilizada a resina acrílica termopolimerizável de cor rosa Lucitone 550 (Dentsply International INC.[®]), homogeneizada com auxílio de uma espátula n° 31 (SS White Art. Dentários Ltda[®]) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos[®]), utilizando-se a proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido, conforme orientações do fabricante. O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante para resina acrílica (S.S. White Artigos Dentários[®]), com auxílio de um pincel de pêlo de marta (Condor S.A.[®]), preenchido com a resina acrílica na fase plástica e fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5 kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica se apresentou estável, a pressão foi aumentada para 1 kgf e, por fim, até atingir 1,5 kgf. Após a estabilização do ponteiro em 1,5 kgf e escoamento completo do excesso da resina acrílica, a mufla foi novamente aberta, e a película de resina acrílica excedente

eliminada com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White Art. Dentários Ltda[®]). A mufla foi novamente fechada e levada para prensa hidráulica sob pressão de 1,5 kgf durante 30 minutos.

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia[®]), passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais, e levada em água à polimerizadora microprocessada digital, modelo Banho Maria (Solab[®]), para que se proceda a termopolimerização com a seguinte programação: a temperatura da água foi elevada até 73°C e mantida estável durante 90 minutos; em seguida, aumentada até atingir 100°C, que foi mantida por mais 30 minutos.

Após o período de polimerização dos corpos de prova, as muflas foram removidas da polimerizadora microprocessada digital e deixadas sobre a bancada para resfriar por um período de aproximadamente cinco horas. Após o resfriamento completo, procedeu-se a demuflagem dos corpos de prova e os excessos (rebarbas) de resina foram desgastados com o auxílio de uma lixa d'água na granulação 80 (Norton Abrasivos[®]) em politriz circular (Struers-Panambra[®]) em baixa velocidade, sob refrigeração. A escolha da granulação da lixa de polimento teve como objetivo promover uma superfície rugosa nos corpos de prova de aproximadamente 2 µm, capaz de facilitar a posterior adesão fúngica à superfície do acrílico.

Em seguida, os corpos de prova foram submetidos à limpeza em ultrassom (Arotec Odontobrás[®]) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina. Posteriormente, foram deixados ao ar livre para secagem e enviados para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil – Central de esterilização comércio e indústria[®]).

Para a análise da atividade antiaderente do *E. giganteum* sobre biofilmes de *C. albicans* na resina acrílica termopolimerizável, foram utilizadas soluções aquosas do extrato hidroalcóolico do fitoterápico em diferentes concentrações sobre corpos de prova de resina (n=3 por grupo, em cada experimento).

Os corpos de prova foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos (n=5) de tratamento: Grupo E50: imersão em 5 mL da solução aquosa de 50 mg do extrato de *Equisetum giganteum*; Grupo E25: 5 mL da solução aquosa de 25mg do extrato de *E. giganteum* por 10 minutos;

Grupo E16: 5 mL da solução aquosa de 16 mg do extrato de *E.giganteum* por 10 minutos;

Grupo CTRL/NaOCl: 5 mL de hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) por 10 minutos (grupo controle);

Grupo CTRL/PBS: 5 mL de PBS estéril por 10 minutos (grupo controle).

O tratamento químico foi efetuado no interior da cabine de segurança microbiológica, retirando os corpos de prova do envelope de esterilização com auxílio de uma pinça (SS White Duflex[®]) esterilizada e imergindo-os, individualmente, nas diferentes soluções. Posteriormente, os corpos de prova foram lavados em 5 mL de PBS estéril, por três vezes (1 minuto cada lavagem), para remoção dos resíduos. A figura 2 exemplifica as etapas para a confecção dos corpos de prova em resina.

4.6.2 Desenvolvimento de biofilme microbiano

Após os diferentes tratamentos, os corpos de prova foram colocados em placas de cultura de seis poços (Transadiningen[®]) e foram aplicados, sobre sua superfície, 5 mL do inóculo de *C. albicans*, a uma concentração de 1×10^7 céls/mL, considerada ideal para formação dos biofilmes de *C. albicans* (CHANDRA et al., 2001b). O tempo de adesão foi de 90 minutos a temperatura de 37°C, sob agitação de 75 rpm, em incubadora (Nova Ética[®]) (CANNON; CHAFFIN, 2001). Após este período, as células que não aderiram ao acrílico foram removidas através de lavagem, imergindo suavemente os corpos de prova em 5 mL de PBS. Na sequência, os corpos de prova foram submersos em 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich[®]) e incubados a 37°C sob agitação de 75 rpm, para crescimento do biofilme (BIZERRA et al., 2008).

Após as 12 horas de formação do biofilme, os corpos de prova apresentaram, na superfície, substância não celular (polimérica), a qual se assemelha a uma “névoa” que cobre as microcolônias do fungo (CHANDRA et al., 2001b). Em seguida, os corpos de prova foram retirados da incubadora e levados para a câmara de fluxo laminar; cada corpo de prova foi lavado em PBS e transferido para uma nova placa de 6 poços, contendo 1 mL de PBS, misturado com 1µM do fluorocromo SYTO-9 e 1µM do fluorocromo iodeto de propídeo (kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability[®]). Na sequência, foram aguardados 20 minutos para que houvesse a

difusão dos fluorocromos no biofilme microbiano (JIN et al., 2005), na ausência de luz a 37°C, de acordo com as orientações do fabricante.

Imediatamente após o período de incubação, cada corpo de prova foi cuidadosamente montado em lamínula de vidro associada a óleo de imersão, com a face rugosa para baixo, para análise do biofilme em microscópio confocal de varredura confocal a laser (Leica TCS – SPE[®]), por meio de objetiva com lente de imersão em óleo (40x; abertura numérica de 1,15). A captação das imagens proporcionou, além da visualização das espécies, a espessura (μm) de cada biofilme, possibilitando uma comparação entre os biofilmes formados em cada grupo.

A partir de cada corpo de prova, foram adquiridas imagens de 6 campos microscópicos aleatórios, da superfície da resina. Cada campo capturado gerava de 15 a 30 imagens sequenciais (stacks) de diferentes planos focais, separados por um passo de 1 μm . Essas imagens foram analisadas subjetivamente (análise qualitativa) e, posteriormente, transferidas para o programa Leica Application Suite[®] (2.02 build 2038) e BioImage L[®], que proporcionou a identificação e a quantificação por campo do biovolume de microrganismos viáveis e não viáveis, sendo os valores expressos em μm^3 . Em seguida, foram obtidas as médias do biovolume dos biofilmes por grupo.

As células viáveis, sem comprometimento de membrana citoplasmática, apresentaram coloração verde, indicando que somente o SYTO-9 está presente no seu interior. As células não-viáveis, com comprometimento de membrana citoplasmática celular, apresentaram coloração amarelo-avermelhada, indicativa da presença de SYTO-9 e do iodeto de propídeo no seu interior.

Os valores médios de cada grupo foram catalogados para posterior análise estatística.

Figura 2. Confeção dos corpos de prova em resina acrílica: (A) Resina termopolimerizável Lucitone 550; (B) Isolante Cel-Lac e Silicona de condensação Zetalabor; (C) Matriz acrílica; (D) Corpos de prova em silicone; (E) Posicionamento dos CP sobre o gesso e isolamento do molde com Cel-Lac; (F) Colocação da mufla em prensa hidráulica; (G) Mufla aberta após 30 minutos na prensa hidráulica e retirada dos CP de silicone; (H) Pó e acrílico proporcionados e misturados; (I, J) Deposição da resina dentro dos moldes de gesso; (L) Termopolimerizadora digital; (M) CP após demuflagem; (N) Polimento dos corpos de prova em politriz metalográfica.

4.7 Avaliação da viabilidade celular do extrato de *E. giganteum* sobre células epiteliais de palato humano e monócitos: ensaio colorimétrico MTT

4.7.1 Obtenção das células epiteliais de mucosa bucal de palato humano

A partir de culturas primárias previamente obtidas e gentilmente cedidas pela aluna de Doutorado Ana Regina Casaroto (Patologia – FOB – USP), células epiteliais de palato humano armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongeladas e cultivadas, em placa de 6 poços, sobre uma camada de sustentação *feeder-layer*, constituída por fibroblastos de tecido gengival humano. Sempre que os queratinócitos atingiam sub-confluência, os mesmos foram tripsinizados e transferidos para novas garrafas com *feeder-layer* para propagação das mesmas. O

conjunto queratinócito/*feeder-layer* foi, primeiramente, tratado com tripsina 0,05%/EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich®) por 1 a 2 minutos a 37°C, para remoção da camada de sustentação, e por mais 15 minutos a 37°C para remoção dos queratinócitos. Esses queratinócitos tripsinizados foram ressuspensos em meio de cultura DMEM/Ham F12 (Gibco®) suplementado e novamente semeados (6×10^3 células/cm²) sobre nova camada de sustentação (*feeder-layer*). O conjunto queratinócito/camada de sustentação foi mantido em estufa úmida (Ultrasafe®) (5%CO₂/95% ar, 37°C) com meio de cultura DMEM/Ham F12 (Gibco®) suplementado e com trocas do meio a cada 2-3 dias. Hormônio de crescimento epidérmico (EGF, 10 ng/mL) foi também acrescentado ao meio de cultura DMEM/Ham F12 (Gibco®) após a primeira troca do meio.

4.7.2 Ensaio colorimétrico MTT

Para o ensaio colorimétrico MTT, CEPH e monócitos foram semeados em placa de 96 poços na concentração 1×10^4 e 2×10^5 células/poço, respectivamente.

O meio de cultura das células epiteliais (DMEM/Ham F12 - 200 µL) foi removido de cada poço da placa de cultura, e foram acrescentados 200µL de cada concentração do extrato de *E. giganteum* (50, 25, 16, 8 e 4 mg/mL), de água (Controle interno positivo) e Meio (Controle interno negativo), e mantidos em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C - Ultrasafe®) por 12 e 24 horas. Alguns poços recebiam somente o extrato em cada concentração, para que posteriormente os valores de DO correspondentes fossem descontados daqueles valores obtidos a partir das amostras sobre as células plaqueadas. Após os períodos, o extrato foi removido dos poços das placas de cultura, e estes foram lavados 2 vezes PBS para remoção de resíduos do extrato, e 200µL de meio DMEM (Gibco®) incompleto (sem Soro bovino fetal) foram adicionados em cada poço novamente, juntamente com 10µL da solução stock MTT (5mg/mL, MTT-brometo tiazolil azul de tetrazólio, Sigma-Aldrich®). As placas de cultura foram incubadas em estufa de CO₂ (Ultrasafe®) por 3-4 horas e, em seguida, a solução de MTT foi retirada dos poços com cuidado, para não remover os cristais de formazan. Depois, os mesmos foram solubilizados com 150µL de DMSO/poço.

A viabilidade celular foi analisada por meio da leitura da absorbância do conteúdo dos poços das placas, realizada em espectrofotômetro (Synergy Mx Monochromator- Based Biotek®) sob o comprimento de onda de 500 nm. Os testes foram realizados em triplicatas. O mesmo ensaio foi realizado com monócitos, obtidos como previamente descrito, nos períodos de 1, 12 e 24 horas.

O percentual de viabilidade celular foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Média da absorbância dos poços testes}}{\text{Média da absorbância dos poços controle (Meio)}} \times 100$$

4.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados quantitativos paramétricos (Atividade antiaderente, viabilidade celular de CEPH 12 e 24h e monócitos 1, 12 e 24h e produção de espécies reativas de Oxigênio) foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD). Os resultados dos ensaios Atividade antiaderente e Viabilidade celular de CEPH 24h foram submetidos à Análise de Variância ANOVA One-Way, seguida da análise comparativa pelo Teste de Tukey HSD. Os resultados dos ensaios Viabilidade celular de CEPH 12h e de monócitos 1, 12, 24h, e Produção de espécies reativas de Oxigênio foram submetidos respectivamente à Análise de Variância ANOVA One-Way seguida da análise comparativa pelo Teste de Fisher LSD, e à Análise de Variância ANOVA Two-Way seguida da análise comparativa pelo Teste de Tukey HSD. Os resultados quantitativos não-paramétricos do ensaio de Concentração Inibitória Mínima foram apresentados como mediana $\pm$ desvio padrão (SD) e foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis, seguido da análise comparativa pelo Teste de Miller, de acordo com as análise de normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como indicativos de significância estatística.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de *E. giganteum*

O processo de extração por percolação das partes aéreas de *E. giganteum* e de suas frações *n*-butanol, acetato de etila e diclorometano teve um rendimento de 8,24%; 0,2%; 1,2% e 0,48%, respectivamente. Devido ao baixo rendimento das frações, optou-se por trabalhar com o extrato bruto (extrato EtOH 70% de *E. giganteum*).

5.1.1 Análise por UHPLC-PAD-MS e FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ do extrato EG EtOH 70%

Foi realizada a caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato EtOH 70% de *E. giganteum* (EG EtOH 70%) por ESI-IT-MS/MS, no modo de inserção direta da amostra. Uma alíquota de 100 µg do EG EtOH 70% foi dissolvida em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1 v/v) e, em seguida, filtrada em membrana de PTFE com poro de 0,45 µm. A solução foi introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsional por um sistema de bombeamento em fluxo de 15 µL min⁻¹.

A identificação dos compostos presentes no extrato das partes aéreas de *E. giganteum* foi realizada através da análise de dados de UV, MS e Rt e comparada com a literatura, revelando semelhança com os dados de Francescato et al., 2013.

Com auxílio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm, obtiveram-se espectros na região do UV para os picos eluídos (Figura 3). Foram verificados picos com bandas de absorção com máximos na região do UV em 253-258 nm e entre 355-373 nm, sugerindo a presença de compostos derivados de pironas (BECKERT, 2002). Ainda, observaram-se picos com bandas de absorção típicos de flavonoides, os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel-A, bem como a Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel-B (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Fragmentos de massas diagnósticos em m/z 379, 301 e 285 caracterizaram agliconas de pirona, quercetina e kaempferol respectivamente; e em m/z 178 e 192, compostos derivados de ácido cafeico e ferúlico. As perdas neutras de 162 unidades de massa permitiram identificações de hexoses (soforosídeo ou glucose) (Figura 4 e Tabela 1). Para análises por UHPLC-PAD-MS, uma alíquota de 10 mg do extrato EG EtOH 70% foi solubilizada em MeOH:H₂O (1: 1 v/v) e analisada no modo negativo. Os dados obtidos são apresentados na Figura 3 e na Tabela 1.

Figura 3. Cromatograma analítico obtido na análise por UHPLC-PAD-MS do extrato EtOH 70% das partes aéreas de *E. giganteum*. Sistema de eluição: A (MeOH + 0,1% AF) e B (H₂O + 0,1% AF). Gradiente linear: 5-100% de A em B em 20 min. Coluna Thermo Scientific® (50 x 2.1 mm, 1.9 μ m). Forno de coluna: 25 °C. Fluxo 0,4 mL min⁻¹, λ = 254 nm. Volume de injeção: 10 μ L. Os picos estão numerados de acordo com os compostos listados na Tabela 1.

A Figura 4 mostra o espectro de massas com os íons precursores das moléculas desprotonadas ([M-H]⁻) do extrato EtOH 70% de *E. giganteum*.

EGEtanol_50ppm#1-6403 RT: 17.64-30.47 AV: 1179 NL: 8,61E2
T: ITMS - c ESI Full ms [50,00-1000,00]

Figura 4. Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS do extrato EtOH 70% de *E. giganteum* analisado em modo negativo. (●) íons fragmentados.

Tabela 1. Dados obtidos por UHPLC-PAD-MS (espectros no UV e íons detectados) e FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ (íons produtos), e identificação de compostos presentes no extrato EtOH 70% das partes aéreas de *E. giganteum*.

Pico	R _t (min)	UV ($\lambda_{\text{máx}}$)	UHPLC- MS íons [M – H] [–]	FIA-ESI-IT- MS ⁿ	Composto
1	9,99	266,350	787	463, 301	Quercetina-tri-O- hexosídeo
2	10,56	265, 344	771	609, 428, 285	Kaempferol-3-O-soforosídeo-7-O-glu
3	10,97	254,366	585	422, 379, 259	3-hidroxihipidina-3,4-di-O-glucosídeo
4	11,61	218, 295sh, 327	625,07	463,301	Quercetina-3,7-di-O-glucosídeo
5	11,69	278, 305sh, 327	625,01	463,301,255,178	Quercetina-3-O- (cafeoil)-glucosídeo
6	12,08	264, 341	609	447, 327, 285, 255	Kaempferol-3,7- di-O-glucosídeo
7	12,73	270, 361	625	462,301	Flavonol-di-O-hexosídeo
8	13,44	254, 331, 369	423	379, 287, 261, 217	Equisetumpirona
9	13,53	216, 291, 328	--	215, 178, 160, 142	Derivado de ácido cafeico
10	14,03	265, 287sh, 341	609	285	Kaempferol-3-O- soforosídeo
11	14,55	270, 347	463	301	Quercetina-hexosídeo
12	14,83	275, 297sh, 331	463	309, 192, 177, 133	Derivado de ácido ferúlico
13	15,65	265, 344	447	285	Kaempferol-3-O-glucosídeo

Aliada à técnica de FIA-ESI-IT-MS/MS, o experimento por UHPLC-PAD-MS possibilitou a detecção e a identificação de 13 compostos simultaneamente presentes no extrato hidroalcolico de *E. giganteum*, através da combinação da interpretação do tempo de retenção, espectro de UV e das fragmentações obtidas. Estes dados corroboram os dados de Francescato et al., 2013.

O estudo da composição química do extrato EG EtOH 70% evidenciou a presença de compostos fenólicos derivados dos ácidos cafeico e ferúlico, heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina e kaempferol, além de estilpironas.

As estruturas dos compostos identificados no extrato EtOH 70% das partes aéreas de *E. giganteum* são apresentadas na Figura 5.

Composto	Composto					
Derivado de ácido cafeico	Derivado de ácido ferúlico

Composto	R ¹	R ²	R ³	Composto	R ¹	R ²
Kaempferol-3-O-sophorósido-7-O-glu	O-Sof	O-	H	Equisetumpirona	O-Glu	OH
		Glu				
Kaempferol-3,7- di-O-glucosídeo	O-Glu	O-	H	3-hidroxihispídina-3,4-di-O-glucosídeo	O-Glu	O-Glu
		Glu				
Kaempferol-3-O- sophorósídeo	O-Sof	H	H			
Kaempferol-3-O-glucosídeo	O-Glu	H	H			
Quercetina-tri- <i>O</i> - hexosídeo	O-Glu-	OH	OH			
	Glu-Glu					
Quercetina-3,7-di-O-glucosídeo	O-Glu	O-	OH			
		Glu				
Quercetina-3-O- (cafeoil)- glucosídeo	O-Glu-	OH	OH			
	Caf					
Quercetina-hexosídeo	O-Hex	OH	OH			
Flavonol-di-O-hexosídeo	O-Hex-	OH	OH			
	Hex					

Figura 5. Estrutura dos compostos identificados no extrato EtOH 70% de *E. giganteum*.

5.2 Atividade antimicrobiana do fitoterápico *E. giganteum* em relação a *C. albicans* por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O tratamento com o hipoclorito de sódio a 1% ou com os extratos, por 24 horas (t_{final}), resultou em valores inferiores de absorbância em relação àqueles obtidos na leitura inicial (t_0), ou seja, na leitura final a quantidade de microrganismos foi menor que a quantidade inicialmente inoculada, demonstrando que o extrato teve uma ação bactericida/fungicida sobre os microrganismos e não bacteriostática/fungiostática. Desta forma, os resultados foram expressos em porcentagem de morte dos microrganismos (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2. Mediana e desvio-padrão do percentual de morte dos microrganismos *E. coli* O:124, *S. aureus* ATCC 6538 e *C. albicans* SC 5314, após 24 h de incubação com o extrato a diferentes concentrações (mg/mL): 50 (E50), 25 (E25), 16 (E16), 8 (E8) e 4 (E4). Os respectivos controles foram: incubação com meio de cultura (CTRL/Meio) ou com Hipoclorito de Sódio 1% (CTRL/NaOCl).

Amostras	% Morte		
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
E50	100±2,55	100,00±0,00	100,00±16,34
E25	87,51±10,39	100,00±0,00	100,00±11,47
E16	86,99±11,26	100,00±0,00	100,00±26,99
E8	52,35±31,78	48,09±31,16	46,24±41,74
E4	26,89±42,14	19,82±46,78	26,99±49,35
CTRL/Meio	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
CTRL/NaOCl	100,00±0,15	100,00±0,00	100,00±0,19

Figura 6. Percentual de morte dos microrganismos após 24h na presença de diferentes concentrações do extrato do fitoterápico, ou de NaOCl 1% (controle positivo). O extrato foi utilizado nas seguintes concentrações (mg/mL): 50 (E50), 25 (E25), 16 (E16), 8 (E8) e 4 (E4). * representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao respectivo controle negativo (CTRL/Meio), o qual revelou ausência de morte de microrganismos (0%). Teste de Kruskal-Wallis e teste de Miller, a partir de cinco experimentos independentes.

Através desse ensaio, foi possível verificar que o extrato de *E. giganteum* na concentração de 50 mg/mL possui ação bactericida comparável ao CTRL/NaOCl (100%), para todas as cepas testadas. Nas concentrações de 25 e 16 mg/mL, esta ação foi semelhante àquela observada no CTRL/NaOCl, sobre o fungo *C. albicans* e sobre a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Em relação a bactéria gram-negativa *E. coli*, o efeito bactericida dos extratos a 25 e 16 mg/mL foi de 87%. Em concentrações mais baixas como 8 e 4 mg/mL, o extrato apresentou uma ação bactericida que variou de 25 a 50% em relação aos três microrganismos testados.

5.3 Produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos, desafiados com *C. albicans*, na presença do extrato de *E. giganteum*

Para a análise da atividade anti-inflamatória das diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum* (50, 25, 16, 8 e 4 mg/mL), os monócitos permaneceram em contato com o extrato por 1 hora e, após isso, foram estimulados ou não com LPS (controle interno positivo) ou com *C. albicans* por 3 horas. A produção de espécies reativas de oxigênio pelos monócitos está demonstrada na Figura 7.

Figura 7. Produção de espécies reativas de oxigênio por monócitos humanos estimulados por 3 horas com LPS ou por *C. albicans*, e sem estímulo (Meio), na presença/ausência prévia de diferentes concentrações (mg/mL) do extrato de *E. giganteum*: 50 (E50), 25 (E25), 16 (E16), 8 (E8) e 4 (E4), por 1 hora. Símbolos iguais representam diferença estatística ($p < 0,05$). Anova Two-way, Teste de Tukey HSD, a partir de quatro experimentos independentes.

O extrato de *E. giganteum*, em todas as concentrações testadas, resultou em diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos monócitos humanos, quando estimulados por LPS (variando de 2981 a 2496,9 rfu) ou pelo fungo *C. albicans* (variando de 3121,4 a 2847 rfu) em comparação às células estimuladas porém não incubadas previamente com os extratos do fitoterápico (6348 e 5473,4 rfu, respectivamente). Estes níveis diminuídos de ROS foram semelhantes ao níveis basais obtidos pelas células não estimuladas (Meio - 3841,9 rfu). Isto demonstra o potencial anti-inflamatório do fitoterápico sobre monócitos ativados. Vale ressaltar que células não estimuladas apresentaram produção similar de ROS, independente da presença (variando de 3536,9 a 2783,3 rfu) ou não do fitoterápico (3841,9 rfu) (Figura 7).

5.4 Aderência de biofilmes de *C. albicans* sobre a resina acrílica termopolimerizável tratada previamente com extrato de *E. giganteum*

Análise qualitativa

Grupo CTRL/PBS

A análise dos corpos de prova tratados previamente com tampão fosfato (PBS) demonstrou a presença expressiva de *C. albicans* sobre a resina acrílica termopolimerizável. Em todos os campos analisados microscopicamente, as células fúngicas remanescentes se apresentaram aglomeradas, na forma tubular ou filamentosa, típica de hifas (fungos filamentosos). A grande maioria das células fúngicas estava viável. As células não viáveis, embora raras, eram observadas, na sua maioria, nos planos focais mais próximos da superfície da resina (Figura 8), provavelmente pela dificuldade em obtenção de nutrientes nas camadas mais inferiores do biofilme.

Figura 8. Biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com tampão fosfato por 10 minutos (grupo controle). Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença expressiva do referido biofilme na superfície da resina, principalmente na forma filamentosa. (C) representa a sobreposição das imagens.

Grupo CTRL/NaOCI

Os corpos de prova tratados previamente com solução de hipoclorito de sódio a 1% revelaram importante redução da quantidade de *C. albicans* na sua superfície, e as raras células fúngicas remanescentes apresentavam-se somente na forma de levedura e, na maioria, viáveis. As células não viáveis, embora raras, eram observadas, na sua maioria, nos planos focais mais próximos da superfície da resina (Figura 9), provavelmente pela presença residual do desinfetante.

Figura 9. Remanescente de biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se ausência do referido biofilme na superfície da resina, constando apenas algumas células fúngicas na forma de levedura. (C) representa a sobreposição das imagens.

E16

Após tratamento prévio com solução aquosa com 16 mg do extrato do fitoterápico, os corpos de prova revelaram elevada quantidade de *C. albicans* em sua superfície, porém menos expressivo que o grupo CTRL/PBS. Geralmente, as células fúngicas remanescentes apresentavam-se dispersas na forma de hifas, não sendo encontradas formas leveduriformes. A maioria destas células estava viável. As células não viáveis, embora raras, eram observadas, na sua maioria, nos planos focais mais próximos da superfície da resina (Figura 10), provavelmente pela presença residual do fitoterápico.

Figura 10. Biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução aquosa de 16 mg do extrato bruto de *E. giganteum* por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença dispersa do referido biofilme na superfície da resina, predominantemente na forma filamentosa. (C) representa a sobreposição das imagens.

E25

Os corpos de prova tratados previamente com a solução de 25 mg do extrato de *E. giganteum* demonstraram também elevada quantidade de *C. albicans* sobre a resina acrílica, porém menos expressivo que o grupo CTRL/PBS e que o grupo E16. Na maioria dos campos analisados, as células fúngicas remanescentes apresentavam-se dispersas, tanto na forma de levedura, quanto de hifa. A maioria delas apresentava viabilidade. As células não viáveis, embora raras, eram observadas, na sua maioria, nos planos focais mais próximos da superfície da resina (Figura 11), provavelmente pela presença residual do fitoterápico.

Figura 11. Biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução aquosa de 25 mg do extrato de *E. giganteum* por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença dispersa do referido biofilme na superfície da resina, tanto na forma de leveduras quanto na forma filamentosa. (C) representa a sobreposição das imagens.

E50

Os corpos de prova tratados previamente com a solução de 50 mg do extrato de *E. giganteum* demonstraram redução expressiva na quantidade de *C. albicans* sobre a resina acrílica, em comparação com CTRL/PBS e os grupos E25 e E16. Na maioria dos campos analisados, as células fúngicas remanescentes se apresentavam como focos dispersos, tanto na forma de levedura, quanto de hifa. A maioria delas apresentava viabilidade. As células não viáveis, embora raras, eram observadas, na sua maioria, nos planos focais mais próximos da superfície da resina (Figura 12), provavelmente pela presença residual do fitoterápico.

Figura 12. Remanescente de biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável anteriormente tratada com solução aquosa de 50 mg do extrato de *E. giganteum* por 10 minutos. Após a coloração simultânea do biofilme, com SYTO-9 (A) e iodeto de propídeo (B), nota-se a presença ínfima e dispersa do referido biofilme na superfície da resina, predominantemente na forma leveduriforme. (C) representa a sobreposição das imagens.

Análise quantitativa

Com base na análise das imagens, a partir dos 6 experimentos independentes, notou-se grande variabilidade do biovolume em todos os grupos analisados. No grupo CTRL/PBS, o biovolume de células viáveis variou de 54.779,59 a 142.208,85 μm^3 , e o biovolume de células não viáveis variou de 600,18 a 3.473,47 μm^3 . Por outro lado, o biovolume de células viáveis do grupo CTRL/NaOCl variou de 225,83 a 688,73 μm^3 , e o biovolume de células não viáveis variou de 50,58 a 225,17 μm^3 .

Nos grupos tratados com fitoterápico (E50, E25 e E16), o biovolume de células viáveis variou de 1.240,15 a 10.968,58 μm^3 , 23.626,61 a 35.731,82 μm^3 , e de 25.730,25 a 37.967,35 μm^3 , respectivamente; enquanto que o biovolume de células não viáveis variou de 0,92 a 79,36 μm^3 , 246,08 a 4.107,19 μm^3 , e de 859,97 a 2.476,62 μm^3 , respectivamente.

A Tabela 3 demonstra a média e o desvio-padrão do biovolume de células viáveis e de não viáveis, em μm^3 , para cada um dos grupos.

Tabela 3. Média e desvio-padrão do biovolume de células viáveis e de não viáveis, remanescentes na superfície dos corpos de prova, após os diferentes tratamentos prévios com extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25) ou a 16 mg (E16), com PBS (CTRL/PBS) e com Hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl), a partir da análise de 18 corpos de prova para cada um dos grupos.

GRUPOS	Células viáveis (μm^3)	Células não viáveis (μm^3)
E50	4231,74 $\pm$ 4007,03	31,29 $\pm$ 30,24
E25	28.825,29 $\pm$ 4177,61	2.583,05 $\pm$ 1.374,53
E16	34.063,22 $\pm$ 4349,52	1.385,35 $\pm$ 600,54
CTRL/PBS	94.060,39 $\pm$ 39357,20	1.428,45 $\pm$ 1.031,97
CTRL/NaOCl	386,17 $\pm$ 174,75	103,19 $\pm$ 69,36

Como os grupos não apresentavam homogeneidade de variâncias, para poder utilizar a Análise da Variância, foi feita a transformação logarítmica dos valores. Após isso, os dados passaram tanto pelo critério da normalidade, apresentando $p > 0,05$, como da homogeneidade de variância (ANOVA One-way). A partir do teste ANOVA, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto para células viáveis quanto não viáveis ($p = 0,00000$). Consequentemente, foi aplicado o teste paramétrico de Tukey, possibilitando a

comparação entre os grupos, a fim de determinar entre quais soluções houve diferença estatisticamente significativa. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Todas as concentrações do extrato do fitoterápico resultaram em biovolumes de células viáveis diferentes estatisticamente em relação aos tratamentos controle, ou seja, CTRL/PBS e CTRL/NaOCl (Tabela 4), demonstrando que os extratos interferem na aderência do fungo *C. albicans* sobre a resina acrílica termopolimerizável, já que os respectivos biovolumes foram menores em comparação ao tratamento prévio com PBS. Os biovolumes de células fúngicas viáveis, após tratamento com o fitoterápico na maior concentração, ou seja 50 mg (E50), foram menores comparativamente aos grupos E25 e E16. Entretanto, não houve diferença entre os biovolume destes dois grupos, ou seja E25 e E16.

Tabela 4. Grupos com diferença estatisticamente significativa entre eles, e seus respectivos níveis de significância ($p < 0,05$), com relação às médias do biovolume de células viáveis na superfície dos corpos de prova. Os resultados foram obtidos por meio do teste Tukey HSD, a partir das médias obtidas após os diferentes tratamentos prévios com as soluções aquosas do extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25) ou a 16 mg (E16), com PBS (CTRL/PBS) e com Hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl) (n=9).

GRUPOS	Nível de significância ($p < 0,05$)
E50 x CTRL/PBS	0,00013
E50 x CTRL/NaOCl	0,00013
E50 x E25	0,00013
E50 x E16	0,00013
E25 x CTRL/PBS	0,00020
E25 x CTRL/NaOCl	0,00017
E16 x CTRL/PBS	0,00042
E16 x CTRL/NaOCl	0,00017
CTRL/PBS x CTRL/NaOCl	0,00017

Quanto às células não viáveis, os extratos do fitoterápico resultaram em biovolumes baixos, principalmente na maior concentração, ou seja 50 mg (E50), cujo biovolume foi inferior em comparação àqueles relacionados às outras concentrações do fitoterápico, bem como ao tratamento com NaOCl. Nesta análise de biovolume, os grupos E25 e E16 mostraram similaridade em relação ao tratamento com PBS, porém valores maiores em comparação ao tratamento com NaOCl (Tabela 5).

Tabela 5. Grupos com diferença estatisticamente significativa entre eles, e seus respectivos níveis de significância ($p < 0,05$), com relação às médias do biovolume de células não viáveis na superfície dos corpos de prova. Os resultados foram obtidos por meio do teste Tukey HSD, a partir das médias obtidas após os diferentes tratamentos prévios com as soluções aquosas do extrato a 50 mg (E50), 25 mg (E25) ou a 16 mg (E16), com PBS (CTRL/PBS) e com Hipoclorito de sódio a 1% (CTRL/NaOCl) ($n=9$).

GRUPOS	Nível de significância ($p < 0,05$)
E50 x E25	0,00013
E50 x E16	0,00013
E50 x CTRL/NaOCl	0,03022
E25 x CTRL/NaOCl	0,00023
E16 x CTRL/NaOCl	0,00083
CTRL/PBS X CTRL/ NaOCl	0,00106

5.5 Análise da citotoxicidade do extrato de *E. giganteum* sobre monócitos humanos, por meio do ensaio colorimétrico MTT.

A partir do ensaio colorimétrico MTT, foi possível estabelecer um índice quantitativo de viabilidade celular dos monócitos ao longo de 1, 12 e 24 horas em contato com o extrato do fitoterápico nas concentrações de 50, 25, 16, 8 e 4 mg/mL (Figuras 13 a 15).

Figura 13. Percentual de viabilidade de monócitos na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum* ou da água (Controle interno positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle interno negativo), por 1 hora. * $p < 0,05$ quando comparado com o Controle interno positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de cinco experimentos independentes.

Figura 14. Percentual de viabilidade de monócitos na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum* ou da água (Controle interno positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle interno negativo), por 12 horas. * $p < 0,05$ quando comparado com o Controle interno positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de quatro experimentos independentes.

Figura 15. Percentual de viabilidade de monócitos na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum* ou da água (Controle interno positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle interno negativo), por 24 horas. * $p < 0,05$ quando comparado com o Controle interno positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de oito experimentos independentes.

Houve manutenção da viabilidade dos monócitos, após contato com o fitoterápico, em todas as suas concentrações, nos períodos de 1 e 24 horas (Figuras 13 e 15), já que os percentuais de viabilidade celular foram maiores que o controle interno positivo (Água).

Após contato com o fitoterápico na concentração de 4 mg/mL, por 12 horas (Figura 14), o percentual de viabilidade celular não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle interno positivo ou ao controle interno negativo (Meio). No mesmo período, mas na concentração de 8mg/mL, houve um pequeno decréscimo da viabilidade dos monócitos em relação ao controle negativo, mas com diferença em relação ao controle interno positivo.

De forma interessante, observou-se ainda que monócitos em contato com as maiores concentrações do fitoterápico (50, 25 e 16 mg/mL), por 12 ou 24 horas, apresentaram um aumento no percentual de viabilidade em relação ao controle interno negativo (Meio). A avaliação por microscopia de luz de fibroblastos gengivais humanos sugere resultados semelhantes (Anexo A e B). Isto será reavaliado posteriormente, através de ensaios mais específicos, com a finalidade de averiguar se o extrato possui algum efeito sobre a proliferação celular.

5.6 Análise da citotoxicidade do extrato de *E. giganteum* sobre células epiteliais de palato humano (CEPH), por meio do ensaio colorimétrico MTT

Através do ensaio colorimétrico MTT com as células epiteliais de palato humano (CEPH), foi possível estabelecer um índice quantitativo de viabilidade celular ao longo de 12 e 24 horas, após contato com o extrato de *E. giganteum* nas concentrações 50, 25, 16, 8 e 4 mg/mL (Figuras 16 e 17).

Figura 16. Percentual de viabilidade de células epiteliais de palato humano (CEPH) na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum* ou da água (Controle interno positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle interno negativo), por 12 horas. * $p < 0,05$ quando comparado com o Controle interno positivo. Anova One-way, Teste de Fisher LSD, a partir de seis experimentos independentes.

Figura 17. Percentual de viabilidade de células epiteliais de palato humano (CEPH) na presença in vitro de diferentes concentrações do extrato de *E. giganteum* ou da água (Controle interno positivo) ou apenas do meio de cultura (Controle interno negativo), por 24 horas. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Controle interno positivo. Anova One-way, Teste de Tukey HSD, a partir de três experimentos independentes.

A viabilidade das CEPH, após contato com o fitoterápico, em todas as suas concentrações, foi mantida, nos períodos de 12 e 24 horas, exceto na concentração de 4 mg/mL, no período de 24 horas, cujo percentual não diferiu daquele observado no controle interno positivo (Água). No mesmo período, mas na concentração de 8mg/mL, houve um pequeno decréscimo da viabilidade das CEPH em relação ao controle interno negativo, mas com diferença em relação ao controle interno positivo. Como verificado entre os monócitos, após 12 e, principalmente, 24 horas, na presença das maiores concentrações do fitoterápico (50, 25 e 16 mg/mL), houve um aumento no percentual de viabilidade das CEPH em comparação ao controle interno negativo. A avaliação por microscopia de luz de fibroblastos gengivais humanos sugere resultados semelhantes (Anexo A e B). Isto será confirmado posteriormente através de ensaios mais específicos, revelando se o extrato possui algum efeito sobre a proliferação celular.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A formação de biofilmes compostos por *C. albicans*, em especial sobre superfícies internas de próteses totais superiores, é considerada crítica para o desenvolvimento da estomatite protética (EP), em associação com outros fatores como diabetes mellitus e estados imunossupressores, já que a EP é uma doença multifatorial. Embora outros microrganismos também componham os biofilmes formados sobre próteses removíveis, os fungos *C. albicans* são considerados os mais frequentes e principais agentes etiológicos da EP (ARENDORF e WALKER, 1987; NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998). Este fungo tem a capacidade inerente de aderir às resinas acrílicas termopolimerizáveis utilizadas na confecção destas próteses; tal adesão constitui um evento primário necessário para sua colonização, a qual associa-se fortemente à patogênese da EP (NIKAWA et al., 1991). Por esta razão, no presente trabalho, avaliamos apenas biofilmes formados exclusivamente por este microrganismo.

Visto a forte relação entre EP e fungos *Candida*, é de fundamental importância a adequada higienização das próteses por parte do usuário, utilizando-se de meios físicos, como a escovação, e, se necessário, químicos, como a imersão das próteses em soluções desinfetantes (PAVARINA et al., 2003; BARNABÉ et al., 2004). Ainda, a terapia medicamentosa antifúngica local ou sistêmica pode ser uma opção, em alguns casos de EP (PEREZOUS et al., 2005); porém, deve-se conhecer os fatores predisponentes relacionados ao usuário, eliminando-os ou modificando-os, quando possível. De nada adianta a terapia medicamentosa, se esta não estiver associada com a conscientização e com a alteração dos fatores colaboradores da EP.

Muitas vezes, após o término da terapia antifúngica, há o rápido restabelecimento da EP, possivelmente pela constante contaminação do material resinoso da prótese, que representa um reservatório para o fungo (CHANDRA et al., 2012), e pela incapacidade dos medicamentos, tópicos ou sistêmicos, em eliminar os microrganismos presentes na base das próteses, levando a necessidade de um novo tratamento (LOMBARDI & BUDTZ-JÖRGENSEN 1993; BANTING & HILL 2001). Adicionalmente, o uso contínuo de antifúngicos tópicos, como suspensões de

nistatina e fluconazol (AL-DWAIRI et al., 2012), bem como dos desinfetantes, como o hipoclorito de sódio (NaOCl), o glutaraldeído e a clorexidina, pode induzir alterações nas propriedades superficiais da resina, como rugosidade, dureza e molhabilidade, as quais podem contribuir para a adesão fúngica (NEPPELENBROEK et al., 2005; CARVALHO et al., 2012; AL-DWAIRI et al., 2012). Quanto à terapia antifúngica sistêmica, o seu uso contínuo pode levar a efeitos adversos graves, como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, e à resistência microbiana (LOMBARDI; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993).

Considerando o exposto, terapias alternativas, com potencial antimicrobiano e capacidade de eliminar ou impedir a adesão de *C. albicans* à superfície interna das próteses removíveis, e que não agridam a mucosa e a própria prótese, podem ser extremamente interessantes à população usuária de próteses removíveis, principalmente totais superiores. Dentre estas terapias, a utilização de fitoterápicos pode representar uma promessa singular, visto que muitas plantas têm demonstrado propriedades antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias (RADULOVIĆ et al., 2006; CATALÁN et al., 2008).

Vislumbrando atender as necessidades desta população, iniciamos estudos sobre os benefícios farmacológicos de um fitoterápico, a fim de averiguar futuramente se o mesmo apresenta benefícios quanto a melhora ou prevenção da EP. Além disso, preocupamo-nos e avaliamos sua compatibilidade biológica sobre nossos tecidos, com ênfase no revestimento epitelial de palato, já que a EP é mais comum na arcada superior, portanto em pacientes usuários de próteses totais superiores (FIGUEIRAL et al., 2007; VANDEN ABEELE et al., 2008).

Sendo assim, o presente estudo teve como propósito, de forma inédita, analisar os efeitos antimicrobianos do fitoterápico *E. giganteum* sobre *C. albicans*, os seus efeitos antiaderentes sobre este fungo em resina termopolimerizável, o seu potencial anti-inflamatório sobre monócitos in vitro, bem como sua citotoxicidade sobre monócitos e células epiteliais de palato humano (CEPH) in vitro.

Há poucos estudos abordando a influência de fitoterápicos, de um modo geral, sobre a viabilidade de *C. albicans*, principalmente envolvendo resinas acrílicas (CASAROTO; LARA, 2010). Vale ressaltar que o fitoterápico selecionado, no presente trabalho, o *E. giganteum*, trata-se de uma espécie nativa da nossa região, portanto de fácil acesso. Porém, os trabalhos publicados a respeito de suas atividades biológicas são escassos (KLOUCEK et al., 2005; FRANCESCATO et al.,

2013). Um dos trabalhos revelou sua atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis* (KLOUCEK et al., 2005). Por outro lado, a espécie vegetal *E. arvense*, de origem européia, tem sido amplamente estudada, estando relacionada com inúmeros efeitos benéficos, tais como antioxidante, diurético, anti-inflamatório e relaxante vascular. Portanto, as espécies *Equisetum* são consideradas, hoje, plantas promissoras na área da saúde (GRAEFE; VEIT, 1999).

Equisetum giganteum como antimicrobiano para *C. albicans*:

Embora sem potencial bacteriostático, a ação microbicida do fitoterápico *E. giganteum* foi evidente, em nossos achados, mesmo na menor concentração testada (4 mg/mL), e não apenas contra *C. albicans*, mas também em relação às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, utilizadas como parâmetros de comparação em nosso estudo. O fitoterápico na concentração de 50 mg/mL apresentou uma ação microbicida comparável ao hipoclorito de sódio 1%, um desinfetante largamente aplicado na prática clínica, para o tratamento da EP, por ser um agente fungicida e bactericida, atuando diretamente sobre a matriz orgânica, dissolvendo a estrutura do polímero formado nos biofilmes e reduzindo significativamente a adesão de mais fungos (BARNABÉ et al., 2003).

Ressaltamos ainda que os nossos valores referentes à ação microbicida foram superiores àqueles relatados por Kloucek et al., 2005, ao avaliarem o mesmo fitoterápico sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas. Outro aspecto que realça a significativa atividade microbicida do *E. giganteum* é que, em nosso estudo, este fitoterápico foi eficaz contra uma cepa clínica de *E. coli* (O1124), a qual, por ser isolada de pacientes, geralmente apresenta mais resistência e mais patogenicidade que as cepas padrão (GILLESPIE, 2001). Mesmo nas menores concentrações do extrato (8 e 4 mg/mL), a atividade bactericida sobre esta cepa de *E. coli* variou de 26 a 52% de morte.

Baseado em nossos resultados, consideramos, portanto, o *E. giganteum* um excelente microbicida, e com potencial, após estudos complementares, para aplicação clínica em doenças infecciosas ou relacionadas com microrganismos, incluindo a EP. Já que a presença de bactérias, na superfície da resina das próteses removíveis, favorece a adesão de blastóporos do fungo pela co-agregação (SATO et

al., 1997), possivelmente a eficácia antimicrobiana do *E. giganteum*, observada no presente trabalho, contra bactérias gram-positivas *S. aureus* e gram-negativas *E. coli*, além do fungo *C. albicans*, constitui mais um benefício do fitoterápico, fortalecendo a hipótese promissora de sucesso na sua utilização para o tratamento tópico da EP. Entretanto, torna-se de extrema importância avaliar se o fitoterápico possui os mesmos efeitos microbicidas sobre outras espécies bacterianas que compõem a microbiota bucal.

O nosso estudo químico do extrato hidroalcóolico de *E. giganteum* revelou a presença de compostos fenólicos derivados dos ácidos cafeico e ferúlico, e heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina e kaempferol, além de estilipironas.

Os flavonoides constituem um grande grupo de compostos polifenólicos, como a quercetina, a hesperidina, a apigenina e a luteonina, as quais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, com conhecidos benefícios na defesa contra infecções, doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças relacionadas ao envelhecimento (KUMAR; PANDEY, 2013). Provavelmente, os flavonoides presentes na composição do *E. giganteum* sejam os constituintes responsáveis pelos efeitos microbicidas, observados por nós, visto que os mesmos têm a capacidade de inativar adesinas e proteínas de transporte microbianas, além de romper membranas microbianas (COWAN, 1999; KUMAR; PANDEY, 2013).

Equisetum giganteum como antiaderente para *C. albicans*:

Um dos modelos experimentais deste estudo mimetizou a porção resinosa das próteses removíveis, por meio de corpos de prova, bem como sua contaminação pelo fungo *C. albicans*, como ocorre nas próteses sob influência do ambiente intrabucal. O período de desenvolvimento do biofilme estabelecido em nosso trabalho foi 12 horas, representando o biofilme intermediário (aproximadamente 12 a 30 horas) (CHANDRA et al., 2001b), o qual foi adequado para promover o desenvolvimento do biofilme sobre estes corpos de prova.

Os biofilmes resultantes não foram espessos, variando de 10 a 25 µm, o que assegurou uma adequada difusão dos fluorocromos permitindo uma boa avaliação microscópica, por meio de microscopia de varredura confocal a laser, e a análise quantitativa. Além desta vantagem, este período de desenvolvimento do biofilme

corroborar o período aproximado de uso diário da(s) prótese(s) pelos pacientes, os quais após 12 horas diurnas de uso, geralmente retiram sua(s) prótese(s) da boca, no período noturno, e subsequentemente higienizam as mesmas.

A aderência do fungo ao substrato está diretamente ligada a algumas propriedades superficiais do substrato, como a rugosidade. Desta forma, neste estudo, utilizamos corpos de prova com rugosidade aproximadamente de 2 μm , superior aos limiares propostos por Quirynen et al., 1990, a qual foi capaz de facilitar a adesão fúngica à superfície do acrílico e ainda reproduziu a rugosidade das superfícies internas das próteses removíveis (PHILLIPS, 1986; (QUIRYNEN et al., 1990).

Nossos resultados revelaram que o tratamento da superfície de resina com o extrato hidroalcolico de *E. giganteum*, em todas as concentrações, resultou em diminuição significativa do biovolume de células viáveis de *C. albicans*, em comparação com a resina não tratada. Porém, chamou-nos a atenção a redução mais expressiva da quantidade de *C. albicans* viáveis sobre a resina acrílica quando tratada com o extrato a 50 mg/mL, em comparação às outras concentrações. Além disso, após tratamento com o fitoterápico, a superfície da resina apresentou fungos dispersos e fungos em ambas as suas formas, leveduriforme e filamentosa, principalmente na maior concentração do extrato. Já que na ausência de tratamento, havia um predomínio da forma filamentosa e os fungos apresentavam-se aglomerados, acreditamos que o fitoterápico, além de possuir um potencial antiaderente sobre o fungo, interfira na expressão de seus fatores de virulência.

Como esperado, o biovolume de células não viáveis sobre as resinas tratadas com o fitoterápico, principalmente na concentração de 50 mg/mL, foi muito baixo, comparável ao tratamento com o hipoclorito de sódio a 1%. Estes achados são coerentes com os potenciais antimicrobiano do fitoterápico, também verificados neste presente estudo.

Por meio de nosso estudo, não podemos afirmar com exatidão o mecanismo e/ou fator responsável pelo efeito antiaderente do fitoterápico *E. giganteum* sobre os biofilmes de *C. albicans*, já que a formação de biofilmes é um fenômeno multifatorial, e o extrato bruto do fitoterápico constitui um complexo de substâncias bioativas, as quais podem atuar por meio de inúmeros mecanismos e sobre diferentes alvos durante o desenvolvimento dos biofilmes (BRAGA et al., 2008; LIU, 2013).

O desenvolvimento dos biofilmes pode ser afetado por diversos fatores biológicos e não biológicos que incluem pH, temperatura, concentração de nutrientes, interações entre as células microbianas e a superfície, tipo de material e a rugosidade da superfície (BOTT, 1993). No caso do hipoclorito de sódio a 1%, utilizado como controle em nosso estudo, o seu pH alcalino (base forte, pH>11) pode ter resultado em aumento da repulsão eletrostática entre as células fúngicas remanescentes e a superfície do material (FUKUZAKI, 2006), bem como ter afetado o metabolismo microbiano (PÖLLÄNEN; PAINO; IHALIN, 2013). A maioria dos biofilmes naturais forma-se sob pH próximo da neutralidade. Desvios para valores superiores ou inferiores do pH 7 afetam diretamente as propriedades superficiais dos microrganismos e das bases sólidas, podendo aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as duas entidades e, deste modo, interferir na adesão dos microrganismos às superfícies sólidas (BOTT, 1995; CHAVES, 2004).

Sendo assim, é possível que o pH ácido (pH = 5,48) do extrato hidroalcóolico de *E. Giganteum*, associado ao seu potencial antimicrobiano, principalmente nas maiores concentrações, possa explicar seu importante efeito antiaderente sobre *C. albicans* nas superfícies de resina termopolimerizável.

Outra hipótese, que deve ser levada em conta com relação ao efeito antiaderente do fitoterápico sobre *C. albicans*, seria aquela que sugere que o extrato pode interagir com e modificar a superfície da resina termopolimerizável, promovendo aumento do ângulo de contato e consequentemente redução da energia livre de superfície da mesma, tornando-a mais hidrofóbica, o que diminuiria a adesão do fungo (COMBE; OWEN; HODGES, 2004; AL-DWAIRI et al., 2012).

Equisetum giganteum como anti-inflamatório para *C. albicans*:

Fitoterápicos apresentam compostos bioativos, como os flavonoides, que são responsáveis pelos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, além dos analgésicos, imunomoduladores e antimicrobianos (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011; KUMAR; PANDEY, 2013). A eficácia de fitoterápicos em eliminar radicais livres, por meio de sua ação antioxidante, resulta em redução do risco para várias doenças crônicas, como tem sido relatado para o chá verde (WU et al., 2010).

Espécies reativas do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS) são produzidas de forma contínua pelas células, durante fenômenos respiratórios e imunes, principalmente por macrófagos e neutrófilos ativados para a destruição de microrganismos. Assim, tais espécies reativas constituem mecanismos microbicidas celulares e representam importantes marcadores biológicos de ativação do processo inflamatório (MITCHELL et al., 2006). Desta forma, ao detectar, no presente trabalho, a redução da produção de ROS por células do sistema imune ativadas por *C. albicans*, foi possível afirmar um dos potenciais anti-inflamatórios do fitoterápico *E. giganteum* frente a este fungo.

Em resumo, em nosso estudo, o extrato hidroalcolico do fitoterápico *E. giganteum*, em todas as concentrações avaliadas, demonstrou supressão da produção de espécies reativas de oxigênio em monócitos humanos estimulados in vitro por LPS ou por *C. albicans*. Oh et al., 2004 também demonstraram redução dos níveis de ROS pela ação de *E. arvense*, atribuindo este efeito à presença dos flavonoides.

Os flavonoides são capazes de eliminar ROS e RNS por doação de hidrogênio e elétron (H⁺) dos grupos hidroxilas presentes na sua composição, estabilizando esses radicais livres (KUMAR; PANDEY, 2013; LIN et al., 2013), ou suprimindo a formação de ROS, por meio da inibição de enzimas envolvidas na sua geração (VILA, 2006; KUMAR; PANDEY, 2013).

Equisetum giganteum como citotóxico para monócitos e células epiteliais de palato:

As células epiteliais de palato humano (CEPH), e em menor grau os monócitos, estão intimamente relacionados com a superfície interna das próteses removíveis, superfície esta passível de contaminação fúngica. As CEPH fazem contato direto com esta superfície, durante o uso das próteses. Por esta razão, selecionamos estes dois subtipos celulares para os ensaios de citotoxicidade com o fitoterápico *E. giganteum*, uma vez que pretendemos realizar futuramente estudos clínicos envolvendo o extrato do fitoterápico *E. giganteum* aplicado sobre a base das próteses ou como solução aquosa, na qual as próteses ficariam imersas.

Felizmente, o fitoterápico *E. giganteum*, em nosso estudo, não alterou a viabilidade de monócitos e das CEPH por até 24 horas. Como exceção, apenas sob a menor concentração testada (4 mg/mL), os percentuais de viabilidade das CEPH foram semelhantes às células danificadas pela água, embora apresentando valores superiores.

De forma interessante, o extrato, nas suas maiores concentrações (50 - 16 mg/mL), resultou em valores de viabilidade celular superiores àqueles detectados entre células não tratadas. Acreditamos então que o extrato fitoterápico, utilizado por nós, forneceu uma mistura complexa de princípios ativos, que de alguma forma induziu a proliferação celular, como previamente observado por Bessa Pereira et al., em 2012, ao avaliar o fitoterápico *E. arvense* (BESSA PEREIRA et al., 2012). Porém, esta afirmação relacionada com *E. giganteum* requer estudos adicionais para que se torne exata e segura.

Caso se confirmem, estes achados fortalecem a possibilidade de se utilizar os extratos de *Equisetum* também com o objetivo de promover resposta celular produtiva, como por exemplo a neoformação óssea, incluindo aquela sobre as superfícies dos implantes de titânio. Vale ressaltar que as espécies de *Equisetum* contêm, além dos flavonoides, uma alta concentração de sílica, um íon associado com o metabolismo ósseo (FERRAZ et al., 2008; BESSA PEREIRA et al., 2012; COSTA-RODRIGUES et al., 2012).

Em resumo, fundamentados nos achados do presente trabalho, acreditamos que a incorporação do fitoterápico *E. giganteum*, sobre a superfície interna do material resinoso das próteses removíveis ou a imersão das mesmas em solução aquosa deste fitoterápico, constituam uma abordagem promissora para a prevenção e ou tratamento da EP, já que tem o potencial de prejudicar a formação de biofilmes nesta superfície, pois trata-se de um agente antimicrobiano e redutor da adesão em resina, frente ao fungo *C. albicans*. Além disso, este fitoterápico não agride nossas células, em especial as epiteliais, que ficam em íntimo contato com a superfície interna das próteses.

Neste contexto, o fitoterápico *E. giganteum* poderá ser uma nova alternativa preventiva ou terapêutica para a EP. Este fitoterápico já é utilizado amplamente na medicina tradicional em outros países, sendo muito aplicado, como agente tópico, em Dermatologia, como adstringente, cicatrizante e anti-inflamatório.

De acordo com a literatura abordada, este é o primeiro relato acerca da atividade antiaderente de um fitoterápico sobre biofilmes de *C. albicans*, induzidos na superfície de resinas acrílicas termopolimerizáveis. Ainda, o presente estudo constitui a primeira evidência de que *Equisetum giganteum* tem atividade anti-inflamatória sobre monócitos, bem como ausência de toxicidade sobre células humanas, tanto epiteliais de palato quanto monócitos.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, o extrato hidroalcoólico de *E. giganteum* apresentou os seguintes benefícios:

1. Microbicida frente a *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*;
2. Antiaderente para *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável;
3. Anti-inflamatório sobre monócitos ativados por *C. albicans*.

Ainda, o fitoterápico não comprometeu a viabilidade de monócitos e de células epiteliais de palato humano in vitro por até 24 horas.

A análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *E. giganteum* revelou a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos, prováveis constituintes responsáveis pelas atividades biológicas acima listadas.

Esses achados permitem a suposição de que *E. Giganteum* possa futuramente constituir uma nova alternativa preventiva ou terapêutica para a EP.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. *Gerodontology*. 1985; 1(5):202-6.
- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922):455-9.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2005; 99(3):325-48.
- Al-Dwairi ZN, Al-Quran FA, Al-Omari OY. The effect of antifungal agents on surface properties of poly(methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res*. 2012;56(4):272-80.
- 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): 222-4.
- Andersen OM, Markham KR. Flavonoides: Chemistry, Biochemistry and Applications. New York: Taylor & Francis Group. 2006; 1197.
- Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979;147(10):267-72.
- Bailley GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46(3): 397-403.
- Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001;21(1):4-8.
- Barnabé W, de Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil*. 2004;31(5):453-9.
-

Beckert C. Biosynthese, Akkumulation und Strukturen von Styrylpyronen in gametophytischen und sporophytischen Geweben von Equisetum. [tese]. Würzburg (Alemanha): Fakultät für Biologie; Universität Würzburg; 2002.

Bessa Pereira C, Gomes PS, Costa-Rodrigues J, Almeida Palmas R, Vieira L, Ferraz MP, Lopes MA, Fernandes MH. Equisetum arvense hydromethanolic extracts in bone tissue regeneration: in vitro osteoblastic modulation and antibacterial activity. Cell Prolif. 2012;45(4):386-96.

Birman EG. Candida e candidoses. In: Tommasi MH, editor. Diagnóstico em Patologia Bucal. 3 ed. São Paulo: Pancast; 2002; 198-9.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by Candida tropicalis and antifungal resistance. FEMS Yeast Res. 2008; 8(3):442-50. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x. Epub 2008 Jan 29.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. Dent Mater. 1997;13(4):258-69.

Bonhomme J, d'Enfert C. Candida albicans biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. Curr Opin Microbiol. 2013;16(4):398-403.

Borges A, Serra S, Cristina Abreu A, Saavedra MJ, Salgado A, Simões M. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity. Biofouling. 2014;30(2):183-95.

Bott, TR. Aspects of Biofilm Formation and Destruction. Corrosion Reviews. 1993;11: 1-24.

Bott, TR. Fouling of Heat Exchangers. Amsterdam: Elsevier. 1995.

Braden M, Wright PS, Parker S. Soft lining materials--a review. Eur J Prosthodont Restor Dent. 1995; 3(4):163-74.

Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal Sasso M. Thymol inhibits Candida albicans biofilm formation and mature biofilm. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31(5):472-7.

Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979; 42(6):619-23.

Bunetel L, Bonnaure-Mallet M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy: update on development mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996; 82(2):161-5.

Busscher HJ, Cowan MM, Van der Mei HC. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol Rev*. 1992;8(3-4):199-209.

Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*. 2011; 11(4):298-344.

Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ*. 2001;65(8):785-7.

Cardoso FL, Murakami C, Mayworm MAS, Marques LM. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. *Rev Bras Farmacogn*. 2010; 20(1): 35-40.

Carvalho CF, Vanderlei AD, Marocho SM, Pereira SM, Nogueira L, Paes-Júnior TJ. Effect of disinfectant solutions on a denture base acrylic resin. *Acta Odontol Latinoam*. 2012;25(3):255-60.

Casaroto AR, Lara V. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*. 2010; 81:323-328.

Catalan A, Herrera R, Martinez A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. *J Prosthet Dent*. 1987;57(5):581-6.

Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(3):327-32.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001a; 183(18): 5385-94

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001b;80(3):903-8.

Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):887-94.

Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Candida biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*. 2012; 55(1):46–57.

Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995;74(3):309-13.

Chen X, Stewart PS. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 59(6):718-20

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):377-83.

Cole DC, Halawa AA, Anaissie EJ. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis*. 1996;22:S73-88.

Combe EC, Owen BA, Hodges JS. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dent Mater*. 2004;20(3):262-8.

Costa-Rodrigues J, Carmo SC, Silva JC, Fernandes MH. Inhibition of human in vitro osteoclastogenesis by *Equisetum arvense*. *Cell Prolif*. 2012;45(6):566-76.

Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci*. 2007;64(4):180-9.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):564-82.

Currie HA, Perry CC. Chemical evidence for intrinsic 'Si' within Equisetum cell walls. *Phytochemistry*. 2009;70(17-18):2089-95.

Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against Candida biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(6):572-6.

Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970; 129(4):151-6.

Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J*. 1972;133(3):101-5.

Davenport JC, Wilson HJ, Spence D. The compatibility of soft lining materials and denture cleansers. *Br Dent J*. 1986; 161(1):13-7.

Desmarchelier, C, Schaus, FW. Sixty Medicinal Plants from the Peruvian Amazon. Ecology, Ethnomedicine and Bioactivity. Peru, Lima, 2000.

Do Monte FH, dos Santos JG Jr, Russi M, Lanziotti VM, Leal LK, Cunha GM. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from Equisetum arvense L. in mice. *Pharmacol Res*. 2004; 49(3):239-43.

Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL, Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res*. 2005; 84(11):966-77.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2):167-93.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1387-92.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(11):685-702.

Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun*. 2000; 68(10):5771-77.

Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*. 2000; 18(5):553-62.

Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001;56(1):5-51.

Ferraz MP, Pereira AC, Lopes MA, Fernandes MH. *Equisetum arvense*: avaliação das possibilidades de aplicação na regeneração Óssea. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. 2008; 5:136-45.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(6):448-55.

Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta*. 2013; 105: 192-203.

Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci* 2006; 11: 147-57.

Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol Plant Microbe Interact*. 2003; 16(9):827-34.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251-60.

Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun*. 1983;41(3):1190-6.

Gillespie SH. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17(3):171-6.

Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50(1):25-32.

Graefe EU, Veit M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine*. 1999;6(4):239-46.

Harrison A, Basker RM, Smith IS. The compatibility of temporary soft materials with immersion denture cleansers. *Int J Prosthodont*. 1989; 2(3):254-8.

Hazen KC, Plotkin BJ, Klimas DM. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infect Immun*. 1986; 54(1):269-71.

Hazen BW, Hazen KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1988;56(9):2521-5.

Hazen KC, Brawner DL, Riesselman MH, Jutila MA, Cutler JE. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun*. 1991;59(3):907-12.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994; 62(3):915-21.

He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006;49(2):80-4.

Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(4):176- 80.

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7(4):336-41.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(1):14-9.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases*. 2004; 10(2): 106-12.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):589-95. Epub 2005 Oct 7.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2005; 159(3):353- 60.

Jorge AOC, Batista JA, Rego MA. Influência da xerostomia na transmissibilidade de *Candida albicans* na cavidade bucal de ratos. *Rev Odontol Unacid*. 2000; 12(1): 121-28.

Khot PD, Suci PA, Miller RL, Nelson RD, Tyler BJ. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1,6-glucan pathway genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3708-16.

Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *J Ethnopharmacol*. 2005;99(2):309-12. Epub 2005 Apr 8.

Koziol-Montewka M, Magrys A, Paluch-Oles J, Bogut A, Buczynski K, Jablonka S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol Invest*. 2006; 35(2):167-79

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002; 70(2):878-88.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1773-80.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013;2013: 1-16.

Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DM, Vergani CE. Effect of experimental photopolymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol*. 2013;58(1):1-9.

Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):999-1007.

Liaqat I, Sabri AN. Effect of biocides on biofilm bacteria from dental unit water lines. *Curr Microbiol*. 2008; 56(6):619-24.

Lin CP, Lin FY, Huang PH, Chen YL, Chen WC, Chen HY, Huang YC, Liao WL, Huang HC, Liu PL, Chen YH. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species and inflammation. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 1-10.

Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr.* 2013;4(3):384S-92S.

Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1993; 2(1):17-22.

Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, Vergani CE. Surface roughness of denture base and reline materials after disinfection by immersion in chlorhexidine or microwave irradiation. *Gerodontology.* 2012; 29(2):375-82. doi: 10.1111/j.1741- 2358.2011.00484.x. Epub 2011 May 27.

McFarland J. The nephelometer; an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA.* 1907; 14:1176-1178.

Mähönen K, Virtanen K, Larmas M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. *J Oral Rehabil.* 1998; 25(4):304-10.

Martins D.M.F.H, Santos, J.G, Jr, Russi M, Lanziotti V.M.N.B, Leal L.K.A.M, Cunha G.M.A. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacol Res.* 2004; 49:239–43.

Martori E, Ayuso-Montero R, Martinez-Gomis J, Viñas M, Peraire M. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. *J Prosthet Dent.* 2013. pii: S0022-3913(13)00298-9.

Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA. Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. *J Am Dent Assoc.* 1999; 130(1):65-72.

Mitchell RN, Kumar U, Abbas AK, Fausto N. Fundamentos de patologia das doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 800, 2006.

Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues Garcia RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent.* 2006;96(3):205-11.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400-28.

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*. 2008;154(Pt 11):3266-80.

Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2006;4:7-25.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS document M100-S11. Wayne, PA, 2002.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. *J Prosthet Dent*. 2005; 93(2):171-6.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil*. 2008; 35(11):836-46.

Neppelenbroek KH, Pinto ECT, Pavarina AC, Vergani CE, Jorge JH, Almilhatti HJ. Aderência de microrganismos em materiais para base de próteses. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*. 2009; 21(2): 126-36.

Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*. 2010;202(1):171-5.

Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3505-8

Newton AV. Denture sore mouth. *Brit Dent J*. 1962;1:357-60.

Nikawa H, Kotani H, Sadamori S, Hamada T. Denture stomatitis and ABO blood types. *J Prosthet Dent*. 1991;66(3):391-4.

Nikawa H, Iwanaga H, Hamada T, Yuhta S. Effects of denture cleansers on direct soft denture lining materials. *J Prosthet Dent*. 1994; 72(6):657-62.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *J Dent*. 1998;26(4):299-304.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*. 1999;12(2):153-9.

Novais PM, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Jorge JH. The occurrence of porosity in reline acrylic resins. Effect of microwave disinfection. *Gerodontology*. 2009;26(1):65-71. doi: 10.1111/j.1741-2358.2008.00251.x. Epub 2008 Aug 14.

Olas K, Butterweck H, Teschner W, Schwarz HP, Reipert B. Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(3):478-90.

Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. *J Oral Rehabil*. 2003;30(11):1085-9.

Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003; 30(5):532-6.

Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J*. 2012;23(5):547-54.

Pendrak ML, Klotz SA. Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;129(2-3):103-13.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med*. 2011;77(4):401-4.

Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005 Mar;93(3):288-93.

Phillips FA. *Materiais dentários de Skinner*. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1986.

Prista LN. Tecnologia farmacêutica. 4 ed. vol 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1995.

Ponniah G, Rollenhagen C, Bahn YS, Staab JF, Sundstrom P. State of differentiation defines buccal epithelial cell affinity for cross-linking to *Candida albicans* Hwp1. J Oral Pathol Med. 2007;36(8):456-67.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. J Clin Periodontol. 1990; 17(3):138-44.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol. 1995;22(1):1-14.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10(1):99-116.

Radulović N, Stojanović G, Palić R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. Phytother Res. 2006;20(1):85-8.

Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res. 2006;6(7):979-86.

Ramage G, Zalewska A, Cameron DA, Sherry L, Murray C, Finnegan MB, Loewy ZG, Jagger DC. A comparative in vitro study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting *Candida albicans* biofilms on denture surfaces and reducing inflammation. J Prosthodont. 2012;21(7):516-22. doi: 10.1111/j.1532-849X.2012.00865.x. Epub 2012 Jun 1.

Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int J Med Microbiol. 2006;296(2-3):149-61.

Ricco RA, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner ML, Gurni AA. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2011;10(4):326-332

Rogers TJ, Balish E. Immunity to *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1980; 44(4):660-82.

Rohrer MD, Bulard RA. Sterilization by microwaves. J Okla Dent Assoc. 1985 Winter;75(3):29-31.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 1980;25(8-9):611-5.

Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. Arch Oral Biol. 2013;58(10):1318-26.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. Aust Dent J. 1997;42(5):343-6

Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. Microbiol. 2004; 150:2807-13.

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

Sharma S, Hegde V. Comparative Evaluation of Antifungal Activity of Melaleuca Oil and Fluconazole when Incorporated in Tissue Conditioner: An In Vitro Study. J Prosthodont. 2014; 23(2):1-7. doi: 10.1111/jopr.12117. Epub ahead of print.

Shinde RB, Raut JS, Karuppayil MS. Biofilm formation by *Candida albicans* on various prosthetic materials and its fluconazole sensitivity: a kinetic study. Mycoscience. 2012; 53(3):220-6.

Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. J Oral Pathol Med. 2005;34(6):340-6.

Silva CH, Paranhos Hde F, Ito IY. Biofilm disclosing agents in complete denture: clinical and antimicrobial evaluation. Pesqui Odontol Bras. 2002; 16(3): 270-5.

Simões LC, Simões M, Vieira MJ. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(19):6192-200.

Singleton VL, Orthofer, R, and Lamuela-Raventos, RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299:152-178.

Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent.* 2001;29(3):197-204.

Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2013; 110(5):356-62.

Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 Jul; 57(10): 1539-50.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005; 579(1-2):200-13.

Sommer L, Mintzer L, Rindasu G. Antimicrobial activity of the volatile oil extracted from *Equisetum arvense*. *Farmacia (Bucharest).* 1962; 10:535-41.

Soustre J, Rodier MH, Imbert-Bouyer S, Daniault G, Imbert C. Caspofungin modulates in vitro adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. *J Antimicrobial. Chemoth.* 2004; 53(3):522-25.

Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. bras.* 2006; 20(1):135-142.

Spatz H, Köhler L, Speck T. Biomechanics and functional anatomy of hollow-stemmed sphenopsids. I. *Equisetum giganteum* (Equisetaceae). *Am J Bot.* 1998;85(3):305.

ten Cate JM, Zaura E. The numerous microbial species in oral biofilms: how could antibacterial therapy be effective? *Adv Dent Res.* 2012;24(2):108-11.

Theilade J, Budtz-Jørgensen E. Electron microscopic study of denture plaque. *J Biol Buccale.* 1980;8(4):287-97.

Thomas CJ, Webb BC. Microwaving of acrylic resin dentures. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1995;3(4):179-82.

Tunnet MM, Gorman SP, Patrick S. Infection associated with medical devices. *Rev Med Microbiol*. 1996; 7:195-205.

The United States Pharmacopeia: the national formulary. 22.ed. Easton: United States Pharmacopeia Convention; 1990. 2067 p.

Ureña JL. Características generales de los hongos patógenos humanos. In: Hill MMG, editor. *Microbiologia Oral*; 1995. p.362-75.

Van Reenen JF. Microbiologic studies on denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1973; 30(4 Pt 2):493-505.

Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008;25(4):222-8.

Vasconcelos MA, Ferreira Dda S, Andrade e Silva ML, Veneziani RC, Cunha WR. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Boll Chim Farm*. 2003;142(8):333-5.

Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. *Arch Oral Biol*. 1992; 37(8):613-22.

Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, McLean RJ. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*. 2007 Jun;78(4):302-10.

Verma SC, Miyashiro T. Quorum sensing in the squid-Vibrio symbiosis. *Int J Mol Sci*. 2013 Aug 7;14(8):16386-401.

Vila FC. Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.). [dissertação]. São Paulo (SP): Instituto de Química; Universidade de São Paulo; 2006.

Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil*. 1998; 25(6):416-23.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J. 1998;43(4):244-9.

Wright CI, Van-Buren L, Kroner CI, Koning MM. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. J Ethnopharmacol. 2007;114(1):1-31.

Zhu H, Sun SJ. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by Tremella fuciformis extract. Curr Microbiol. 2008; 57(5):418-22.

Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Farnesol-induced apoptosis in Candida albicans is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. PLoS One. 2011;6(12):e28830.

APÊNDICE A - Formulário para coleta de dados clínicos dos voluntários**“FITOTERÁPICO *EQUISETUM GIGANTEUM* E ESTOMATITE PROTÉTICA: ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA, ANTIADERENTE E ANTIINFLAMATÓRIA CONTRA *CANDIDA ALBICANS*, E POTENCIAL CITOTÓXICO SOBRE CÉLULAS EPITELIAIS DO PALATO HUMANO”****Rafaela Alves da Silva Alavarce; Dra. Vanessa Soares Lara****GRUPO/Nº:**

Data da coleta:

I. Identificação do paciente:

Nome:

Data de nascimento

Idade:

Gênero:

Naturalidade:

Estado:

Nacionalidade:

Ocupação:

Estado civil:

Endereço Residencial:

Bairro:

Cidade:

Estado:

Telefone:

Tel recado:

Falar com:

II. Anamnese:

1. Faz uso de alguma medicação: 1. Sim 2. Não Qual medicação?
2. Realizou algum tratamento recente: 1. Sim 2. Não Qual tratamento?
3. Frequência de visitas ao médico: _____
4. Há alteração endócrina (diabetes, gravidez, hipo e hipertireoidismo): 1. Sim 2. Não.
5. Realizou alguma cirurgia: 1. Sim 2. Não Qual cirurgia?
6. Apresentou sangramento excessivo: 1. Sim 2. Não
7. Apresenta algum problema na cicatrização: 1. Sim 2. Não
8. Apresenta dor no corpo: 1. Sim 2. Não
9. Sente cansaço mesmo sem exercício físico: 1. Sim 2. Não
10. Apresenta náuseas ou vômito com frequência: 1. Sim 2. Não
11. Apresenta perda ou redução de apetite: 1. Sim 2. Não
12. Houve perda de peso atualmente: 1. Sim 2. Não
13. Apresenta inchaço em alguma parte do corpo: 1. Sim 2. Não
14. Tabagismo: 0. Não 1. + maço 2. ++ 3. +++ 4. ++++ 5. ex-fumante
15. Etilismo: 0. Não 1. + dose 2. ++ 3. +++ 4. ++++ 5. ex-etilista
16. Apresentou distúrbio gastrointestinal recentemente: 1. Sim 2. Não
17. Pratica exercícios físicos: 1. Não 2. até 2x/sem. 3. até 4x/sem. 4. +

III. Exames complementares:

1. Tipo sanguíneo:
2. Glicemia:
3. Hemoglobina glicosilada:
4. Hemograma:

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido **Universidade de São Paulo**
Faculdade de Odontologia de Bauru

PABX: (0XX14) 3235 8000 / FAX: (0XX14) 32234679

APÊNDICE B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A nossa pesquisa tem o objetivo de analisar o potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antiaderente de frações específicas do fitoterápico *Equisetum giganteum* sobre *Candida albicans*, microrganismo fortemente relacionado com a estomatite protética, e o potencial citotóxico dessas frações sobre monócitos (células do sangue). Assim, necessitaremos de amostras de sangue de cinco voluntários devidamente esclarecidos, ou seja os próprios integrantes da pesquisa, incluindo o próprio autor da pesquisa, de tal forma que a coleta será realizada uma única vez, por um farmacêutico, especialista em Análises Clínicas. Os riscos e o desconforto da coleta de sangue são mínimos e de total responsabilidade da pesquisadora responsável pelo projeto. A coleta de sangue é a mesma que se realiza em laboratório de análise, sendo muito segura.

Se comprovado seu efeito antimicrobiano, antiaderente e antiinflamatório, e sua ausência de citotoxicidade, pretendemos futuramente avaliar a utilização do fitoterápico *E.giganteum* como agente tópico a ser adicionado a superfície interna de próteses removíveis, como método preventivo e terapêutico para a estomatite protética, tão comum na população idosa.

Qualquer dúvida é só procurar a aluna Rafaela Alves da Silva Alavarce, no Departamento de Estomatologia, Área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, ou pelo telefone (14) 3235-8251. E se você mudar de idéia e quiser sair da pesquisa, pode ficar à vontade.

“Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14) 3235-8356.”

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do autor

APÊNDICE C - Instrumento de Doação da Cultura de Células Epiteliais de Mucosa de Palato Humano**DECLARAÇÃO**

Eu, Ana Regina Casaroto, portadora da cédula de identidade 7165439-7, declaro estar doando parte da cultura de células epiteliais de mucosa de palato humano para que a mesma seja utilizada na pesquisa de título “Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano”. A cultura celular em questão foi previamente obtida através do projeto de pesquisa “Produção de β -defensina e catelicidina por células epiteliais frente a *Candida albicans*” o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP (protocolo nº 001/2012).

Bauru, de de 2012 .

Ana Regina Casaroto

Prof^ª Dr^a Vanessa Soares Lara
Orientadora

Anexos

ANEXO A - Visualização dos fibroblastos gengivais humanos em contato com extrato 50 mg de *E. giganteum* em microscopia de luz, objetiva 5x, após 24h.

ANEXO B - Visualização dos fibroblastos gengivais humanos em contato com meio de cultura (controle negativo), em microscopia de luz, objetiva 5x, após 24h.

ANEXO C - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fitoterápico Equisetum giganteum e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e antiinflamatória contra Candida albicans, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano.

Pesquisador: Rafaela Alves da Silva Alavarce

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 3

CAAE: 06706412.2.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 141.326

Data da Relatoria: 31/10/2012

Apresentação do Projeto:

Idem ao anterior

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem ao anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores apresentaram os nomes dos voluntários/participantes da pesquisa, no total de 4, incluindo o CV Lattes. O quinto participante é o próprio autor da pesquisa. O cronograma foi devidamente atualizado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

sem considerações

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a documentação está de acordo com a Resolução 196/96, sou de parecer favorável a aprovação deste projeto.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: mferrari@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer APROVADO emitido pelo relator.

Esse projeto foi considerado APROVADO. O CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatórios anuais (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado. Qualquer alteração na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores deverá ser prontamente comunicada. Lembramos que na apresentação do relatório final, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

BAURU, 08 de Novembro de 2012

Assinador por:
Maria Teresa Atta
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: mferrari@fob.usp.br

ANEXO D

03/14

Plataforma Brasil

Saúde

Página 1

Rafaela Alves da Silva Alavarc

Rafaela Alves da Silva Alavarc

Detalhar

Você está em: Pesquisador > Gerir Pesquisa > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

Dados do Projeto de Pesquisa

Título da Pesquisa: Fitoterápico Equisetum giganteum e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e antiinflamatória contra Candida albicans, e citotóxico sobre células epiteliais do palato humano.

Pesquisador: Rafaela Alves da Silva Alavarc

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 3

CAAE: 06706412.2.0000.5417

Submetido em: 09/10/2012

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Situação: Aprovado

Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Documentos Postados do Projeto

Tipo Documento	Situação	Arquivo	Po
Parecer Consubstanciado do CEP	A	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_141326.pdf	08/11/2
Informações Básicas do Projeto	A	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_67064.pdf	09/10/2
Interface REBEC	A	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	09/10/2
Outros	A	Oficio_Coordenador_09_10.pdf	09/10/2
TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	A	tcle.pdf	10/08/2
Folha de Rosto	A	folha_rostoinstituição.pdf	10/08/2

L

Documentos Postados da Notificação

Tipo Documento	Situação	Arquivo	Postagem
Envio de Relatório Final	A	TCLEs comite 1.pdf	28/02/2014 15:45:1

L

Tramitação:

CEP Trâmite	Situação	Data Trâmite	Parecer	Informaç
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Submetido para avaliação do CEP	10/08/2012		
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Aceitação do PP	14/08/2012		
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Parecer liberado	30/08/2012	Esse projeto foi considerado com PENDÊNCIA e con...Ver mais>>	
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Submetido para avaliação do CEP	06/09/2012		
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Aceitação do PP	12/09/2012		
Faculdade de Odontologia de			O Coordenador do CEP acata o	

25/03/14

Plataforma Brasil

Bauru-USP	Parecer liberado	01/10/2012	parecer do Colegiado,... Ver mais>>
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Submetido para avaliação do CEP	09/10/2012	
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Aceitação do PP	10/10/2012	
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Parecer liberado	08/11/2012	Esse projeto foi considerado APROVADO. O CEP-FOB/U... Ver mais>>
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP	Notificação enviada	27/02/2014	Ocorreu uma perda dos documentos, pc

<< < 1 2 > >>

Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável

[Voltar](#)
[Enviar Notificação](#)

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior) ou Mozilla Firefox (versão 2 ou superior).