

***Camellia sinensis* (chá verde) promove atividade antifúngica contra *Candida* spp isolada de pacientes HIV positivos e biocompatibilidade em macrófagos murinos**

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.007-029>

Marta Nicolini Falcão do Monte

Dra., Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Ciência e Tecnologia
Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777—Jardim São Dimas
São José dos Campos, SP, Brazil – 12245-000

Jonatas Rafael de Oliveira

Dr., Universidade Anhembi Morumbi - Faculdade de Medicina
Av. Deputado Benedito Matarazzo, 4050 – Jardim Aquarius
São José dos Campos, SP, Brazil – 12230-002

Luciane Dias de Oliveira

Dr., Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Ciência e Tecnologia
Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777—Jardim São Dimas
São José dos Campos, SP, Brazil – 12245-000

Antonio Olavo Cardoso Jorge

Prof. Dr., Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Ciência e Tecnologia
Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777—Jardim São Dimas
São José dos Campos, SP, Brazil – 12245-000

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro a atividade antifúngica e a citotoxicidade do extrato vegetal de *Camellia sinensis* (chá verde), bem como avaliar o efeito antifúngico da anfotericina B e do fluconazol sobre 22 cepas de *Candida* spp. A concentração fungicida mínima (CFM) e a concentração inibitória mínima (CIM) foram determinadas em células planctônicas utilizando diluições seriadas de extrato de chá verde e antifúngicos. Após a determinação da concentração do extrato na CIM e CFM, foi preparado biofilme para cada cepa. A citotoxicidade em macrófagos de camundongos (RAW 264.7) foi avaliada para avaliar a viabilidade celular desta substância. As unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram contadas, e os dados foram avaliados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para biofilme, observação visual para CIM e CFM, e ANOVA e Tukey para citotoxicidade. Os resultados demonstraram viabilidade do extrato de chá verde nas células analisadas. Concluiu-se neste estudo que o extrato de *C. sinensis* (chá verde) apresentou atividade antifúngica em células planctônicas e em biofilme para todas as cepas de *Candida* avaliadas, sem efeitos citotóxicos sobre a RAW 264.7. O fluconazol exibiu efeito fungicida em células planctônicas, enquanto a anfotericina B apresentou efeito antifúngico sobre cepas de *C. albicans* e resistência microbiana em cepas não-*albicans*.

Palavras-chave: Anfotericina B, Biofilmes, *Camélia sinensis*, Cândida, Fluconazol.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, como pacientes infectados pelo HIV, transplantados ou em tratamento quimioterápico, tanto pelo uso de imunossuppressores quanto por fatores individuais, como idade avançada e doenças sistêmicas, como diabetes mellitus. A cavidade oral representa um dos locais preferidos para o desenvolvimento de leveduras por *Candida* (Samaranayake et al., 2001; Serrano-Granger et al., 2005; Coleman, 2010, Wang, 2015). A candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum entre os pacientes infectados pelo HIV, frequentemente apresentando episódios recorrentes, principalmente quando a contagem de linfócitos CD4 é baixa (Wengeter et al., 2007).

Os derivados azólicos, particularmente o fluconazol, são eficazes no tratamento da candidíase em pacientes com imunodeficiência avançada e constituem o primeiro passo no tratamento dessas infecções. Polienos como a anfotericina B são utilizados em casos graves de infecções sistêmicas, embora apresentem várias desvantagens como nefrotoxicidade (Blakenship & Michell, 2006; Nadagir et al., 2008). (2008) estudaram a prevalência de espécies de leveduras em pacientes HIV-positivos com candidíase orofaríngea e avaliaram sua suscetibilidade aos antimicrobianos. A espécie mais prevalente foi *C. albicans*, seguida por *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis*.

A suscetibilidade aos antifúngicos pode variar entre leveduras isoladas de um mesmo indivíduo, revelando resistência a vários antifúngicos azólicos. Alguns autores, diante da crescente resistência aos antifúngicos convencionais, têm buscado alternativas para o tratamento das lesões de candidíase oral, como o uso de fitoterápicos entre outras terapias alternativas (Vendruscolo et al., 2005; Nakata et al., 2007; Colleman, 2010; Ramage et al., 2011; Oliveira et al., 2013).

As plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas pela humanidade desde a antiguidade. O uso indiscriminado e prolongado de drogas químicas sintéticas tem levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz (Antunes, 2014). A planta *Camellia sinensis* pertence à família Theaceae, popularmente conhecida como chá verde ou chá indiano. Contém substâncias como flavonoides e catequinas, que são potentes componentes terapêuticos como antioxidantes e inibidores da peroxidação lipídica (Narotzki, 2012; Mollashahi, 2015). (2009) avaliaram o efeito antimicrobiano de polifenóis e catequinas encontrados em *C. sinensis* sobre várias espécies de *Candida*, relatando que as substâncias terapêuticas encontradas nesta planta apresentaram atividade antifúngica em todas as espécies analisadas, principalmente em *C. albicans*, e enfatizaram a importância de estudos mais detalhados para aplicação clínica.

Embora seja frequentemente utilizado, o estudo da citotoxicidade do chá verde é necessário para seu uso mais seguro na prática clínica como fitoterápico. Além dos efeitos benéficos, os efeitos

citotóxicos também devem ser considerados para todas as plantas quando utilizadas para fins terapêuticos (Casaroto e Lara, 2010).

As infecções da cavidade oral causadas por *Candida* spp estão relacionadas à formação de biofilme por esses microrganismos (Blankenship & Mitchell, 2006; Thein, 2007; Tsang, 2007). As células que compõem o biofilme possuem características distintas das células planctônicas, como maior resistência aos antifúngicos e às defesas imunológicas do hospedeiro (Oliveira et al., 2013; Gulati e Nobile, 2016). Os biofilmes são compostos por agregação microbiana que pode aderir às superfícies dentárias, bem como a outros materiais restauradores e protéticos (Eike et al., 2004; Mallashahi, 2015).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre tratamentos alternativos e controle da candidíase oral e redução do biofilme, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica do extrato de chá verde e a atividade antifúngica do fluconazol e anfotericina B em leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes HIV-positivos.

2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP com o objetivo de quantificar e qualificar leveduras do gênero *Candida* como resistentes ou sensíveis às substâncias em estudo. A metodologia empregada foi baseada no estudo de Oliveira e colaboradores (2013). Vinte e duas cepas clínicas coletadas em estudo anterior, isoladas da cavidade oral de pacientes HIV positivos com virologia controlada, foram utilizadas. As amostras foram armazenadas em ágar Sabouraud inclinado e mantidas refrigeradas. As cepas foram semeadas em placas de Petri contendo CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, França) e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias foram identificadas morfológicamente de acordo com sua coloração, com verde sugestivo de *Candida albicans*, cinza-azulado de *Candida tropicalis* e rosa de *Candida krusei*. Após o crescimento, colônias de *Candida* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas por 24 horas a 37°C para uso posterior. Foram realizados os seguintes testes de identificação fenotípica: formação de tubo germinativo, microcultura e teste bioquímico API 20 AUX (BioMerieux Clinical Diagnostics, França). Uma amostra padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) foi utilizada para padronização dos ensaios. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia-UNESP, campus São José dos Campos, sob o protocolo 028/2010. A partir do isolamento das espécies de *Candida* obtidas em CHROMagar *Candida*, microcultivo e tubo germinativo, a confirmação das espécies foi realizada pela identificação bioquímica dos isolados. As colônias foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 horas a 37°C. O sistema de identificação API20CAUX (BioMerieux Clinical Diagnostics, França) foi utilizado para identificação bioquímica.

2.1 EXTRATO AQUOSO DE *C. SINENSIS* (CHÁ VERDE)

Utilizou-se um extrato aquoso de chá verde (*C. sinensis*) na concentração de 20%, adquirido de uma farmácia de manipulação (Becker - São José dos Campos, Brasil). O extrato foi armazenado em frasco hermeticamente fechado, protegido da luz e a uma temperatura entre 8 e 12°C até a realização dos ensaios preconizados.

2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato vegetal, foi realizado o método de diluição em caldo. Diluições seriadas do extrato foram preparadas em placas de 96 poços (Costar 3524), adicionando-se 125 µL de meio sintético tamponada RPMI 1640 em pH 7,0 com MOPS (ácido morfolinopanosulfônico), 125 µL do extrato vegetal e 12,5 µL de suspensão padronizada (10^6 células viáveis/mL) de cada cepa de *Candida* spp. Assim, diluições do extrato foram obtidas nas seguintes proporções: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 da concentração original. Após incubação por 24 h a 37°C, as leituras foram realizadas por observação visual da turbidez média. Para o grupo controle nas placas de 96 poços, foram adicionados 125 µL de meio de cultura RPMI e 12,5 µL de suspensão padronizada (10^6 células viáveis/mL) de cada cepa de *Candida* spp. Para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), três inóculos do teste anterior, que não apresentaram crescimento em caldo, foram semeados em placas de ágar Sabouraud Dextrose, determinando-se a CFM como a menor concentração do extrato testado capaz de inibir completamente o crescimento microbiano semeado em meio de cultura sólido.

2.3 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *C. SINENSIS* (CHÁ VERDE) SOBRE O BIOFILME

Para a formação do biofilme, foram utilizados espécimes de resina acrílica, tampas de íris transparentes com pino para confecção de prótese ocular (Clássico, São Paulo, Brasil), medindo 11 mm de diâmetro, esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C. Em seguida, foram divididos em grupos (n=10). Para a obtenção do biofilme, cada linhagem foi semeada em placas de cultura contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubada a 37°C/24 h. Após o período de incubação, uma suspensão do microrganismo foi preparada em solução salina fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) e padronizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil), obtendo-se 10^6 células/mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda foram $0,284 \pm 0,02$ e 530 nm. Após a padronização do microrganismo, os espécimes foram colocados em placas de cultura celular de 24 poços (TPP, Europa), e 2 mL de caldo de sacarose BHI a 5% e 0,1 mL da suspensão do microrganismo foram adicionados. A placa de 24 poços foi incubada em estufa bacteriológica por 5

dias a 37°C. Para cada experimento, 10 espécimes foram tratados com extrato vegetal na concentração definida na CIM. Esse procedimento foi realizado para todas as *cepas de Candida*, considerando um grupo controle (n=10) para cada experimento.

Após a formação do biofilme, os espécimes foram lavados duas vezes em solução salina fisiológica (NaCl 0,85%). Em seguida, foram colocados com o auxílio de pinça estéril em extrato de chá verde a 20%. Os 10 espécimes do grupo controle que não receberam tratamento foram colocados em solução salina fisiológica (NaCl) a 0,85% e posteriormente sonicados. O tempo de exposição ao extrato foi de 5 min. Após o tempo de tratamento, os espécimes foram lavados novamente e colocados em tubos contendo solução salina fisiológica, onde foram agitados por 30 s em um sonicador de potência de 50W (Sonoplus HD 2200-Bandelin Eletronic).

Posteriormente, diluições foram feitas, 10-1, 10-2, 10-3 e 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em duplicata em placas de ágar Sabouraud dextrose (Difco-USA). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa bacteriológica. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de UFC/mL. As placas escolhidas para contagem foram aquelas que apresentaram entre 30 e 300 colônias viáveis de cada diluição. O mesmo procedimento foi realizado para todas as cepas e para o grupo controle.

2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO *EXTRATO DE C. SINENSIS*

Foram utilizados macrófagos de camundongo (RAW 264.7), adquiridos do Laboratório de Cultura de Células da FOSJC - UNESP, obtidos do banco de células da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM - RJ). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Chemical Company, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas em estufa a 37°C com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias, e o monitoramento diário de cada frasco de cultura celular foi realizado com microscópio invertido (Nikon) até que fosse observado um estado de subconfluência das células, caracterizado por mais de 70% de ocupação do frasco. Neste caso, a monocamada celular foi subcultivada. Para o subcultivo, o meio do frasco foi aspirado com pipeta, vertido sobre a monocamada celular e, em seguida, descartado. Posteriormente, as células foram lavadas com meio fresco e novamente descartadas. Em seguida, adicionou-se meio fresco e as células foram cuidadosamente removidas do frasco com raspador celular (TPP). O meio fresco contendo a suspensão celular foi centrifugado em um tubo de falcão a 9.000 rpm por 5 min a 25°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e as células (pellet) foram ressuspensas em meio fresco e distribuídas em novos frascos de cultura celular.

Para o experimento, o mesmo procedimento foi realizado para a subcultura da linhagem celular, porém, após a ressuspensão das células, foi realizada a contagem de células viáveis. Para isso, uma

amostra de 50 μL foi colocada em um microtubo juntamente com 5 μL de corante azul de tripano a 0,5% (Sigma, EUA). Essa mistura foi pipetada e transferida para a câmara de Neubauer, coberta com uma lamínula. A contagem de células viáveis foi realizada em microscópio óptico. Noventa e seis poços foram utilizados para os ensaios de citotoxicidade. Em cada poço foram adicionados 100 μL de DMEM (LGC Biotecnologia) contendo 10^4 células. Após esse procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 h para permitir a adesão das células aos poços.

Após o período de incubação, o meio foi removido e 200 μL da concentração do extrato aquoso do chá verde, obtida para todos os microrganismos testados, em meio de cultura foi adicionada para verificar sua citotoxicidade. Os testes foram realizados em duplicata, e o período de incubação com as substâncias foi de 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após o tempo de incubação das placas de 96 poços contendo o extrato vegetal, o conteúdo foi descartado. Cada poço foi lavado com 200 μL de solução de PBS 3 a 5 vezes. O MTT foi preparado na proporção de 0,5 mg de pó/1 mL de PBS. A solução foi agitada por 10 min com agitador magnético. Cem μL de MTT foram colocados em cada poço, e as placas foram envolvidas em papel alumínio para evitar exposição à luz, em seguida, incubadas por 1 h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e 100 μL de DMSO foram adicionados. As placas foram incubadas por 10 min com agitação por mais 10 min. As placas foram então levadas a um espectrofotômetro com OD (densidade óptica) de 570 nm.

2.5 SENSIBILIDADE DE *CANDIDA* SPP A ANTIFÚNGICOS

Foram utilizados antifúngicos anfotericina B (Sigma Chemical Company, St Louis, EUA) e fluconazol (Galena Química e Farmacêutica). As amostras de *Candida* spp foram testadas quanto à suscetibilidade in vitro aos antifúngicos, seguindo o método de microdiluição proposto pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019). Para a obtenção do inóculo, amostras de *Candida* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 h a 37°C . Após esse período, foram obtidas suspensões padronizadas em solução salina esterilizada (NaCl a 0,85%), resultando em uma concentração inicial de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Posteriormente, a suspensão foi diluída 1:2000 em meio sintético RPMI 1640 tamponado (Sigma Chemical Company, St Louis, EUA) a pH 7,0 com ácido morfolinpropanossulfônico (MOPS), para atingir uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL. O antifúngico anfotericina B foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto o fluconazol foi diluído em água destilada esterilizada. Os antimicrobianos foram preparados nas seguintes concentrações: 320 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, 1250 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol. As soluções antifúngicas foram diluídas em meio sintético RPMI para obtenção de concentrações finais variando de 64 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Para a técnica de microdiluição, foram utilizadas placas de acrílico com 96 poços e tampas de fundo plano (Difco). Em cada poço foram dispensados 100 μL da concentração do antifúngico e 100 μL do inóculo amostra-teste. As placas foram incubadas a 37°C , e as leituras foram

realizadas após 24 e 48 h. Placas contendo anfotericina B foram cobertas com papel alumínio para proteção contra a luz.

Os resultados foram interpretados com base em uma escala visual de turbidez por meio da turvação de um tubo controle representado como: 0 (claro); 1 (levemente nublado); 2 (turbidez intermediária) correspondendo a 80% de redução do crescimento; 3 (turbidez proeminente) e 4 (completamente nublado). Os resultados foram expressos como intervalos entre os valores mínimos e máximos da CIM para cada amostra e também como valores de CIM50 e CIM90, representando o crescimento de 50% e 90% dos isolados, respectivamente. A CIM para azólicos foi definida como a concentração que resultou em aproximadamente 80% de redução do crescimento, enquanto para a anfotericina B correspondeu à concentração com ausência completa de crescimento (100%). Os valores de corte para classificar os antifúngicos e isolados testados como suscetíveis ou resistentes seguiram os critérios estabelecidos por (CLSI, 2019).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o biofilme, foi realizado o teste estatístico de Mann-Whitney, enquanto para a citotoxicidade, foram realizadas análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 CIM E CFM DO EXTRATO DE *C. SINENSIS* (CHÁ VERDE)

Observou-se no presente estudo que o extrato de *C. sinensis* exibiu efeito fungicida contra todas as espécies de leveduras estudadas, tanto na forma planctônica quanto no biofilme. Apesar do extrato apresentar concentração de 20%, para obtenção da CIM, a concentração inicial utilizada foi de 10%, considerando diluição em caldo RPMI tamponado. Todas as cepas avaliadas foram sensíveis ao extrato de chá verde em concentração menor ou igual a 10%, na forma planctônica. Os resultados obtidos em CIM e CFM mostraram variação na suscetibilidade das diferentes cepas de *C. albicans* quanto à concentração das diluições dos extratos. Observou-se que a CIM variou de 1,25% a 5% e a CFM de 2,5% a 10%. A partir da concentração inibitória e fungicida nas células planctônicas, determinou-se a concentração de 20% para avaliar os efeitos do chá verde sobre o biofilme aderido aos corpos de prova. Cepas não-*albicans* apresentaram menor suscetibilidade nas concentrações de extrato avaliadas. A CIM variou de 1,25% a 10% e a CFM variou de 2,5% a 10%. *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram as espécies menos suscetíveis ao extrato, e houve diferença de suscetibilidade entre as espécies de *C. glabrata*.

3.2 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *C. SINENSIS* (CHÁ VERDE) SOBRE O BIOFILME DE *CANDIDA* SPP.

A Tabela 1 mostra que *as cepas de C. albicans* tratadas com extrato de chá verde apresentaram redução significativa de UFC/mL em relação ao grupo controle não tratado, no entanto, houve uma cepa (*C. albicans* 24s) que não apresentou redução significativa em relação ao grupo controle. Os resultados de redução de UFC/mL no biofilme apresentados na Tabela 1 demonstraram que o extrato de chá verde a 20% apresentou efeito fungicida sobre *as cepas de C. albicans* quando em biofilme. A redução percentual média foi de 60%.

Tabela 1 - Unidades formadoras de colônias (UFC/mL), p-valor e percentual de redução, obtidas das 10 cepas de *C. albicans* (n=10) tratadas com NaCl 0,85% (Controle) ou extrato de chá verde 20%.

Coar	UFC/mL		p-valor	Redução (%)
	Controle	<i>C. sinensis</i> (chá verde)		
<i>C. albicans</i> 17	22,100	3,750	0.0002	83
<i>C. albicans</i> 4s	54,800	19,400	0.0002	65
<i>C. albicans</i> 52	95,500	4,650	0.0004	51
<i>C. albicans</i> 1s	41,300	18,300	0.0004	56
<i>C. albicans</i> 10s	48,000	22,750	0.0002	53
<i>C. albicans</i> 24s	36,000	26,000	0.0754	28
<i>C. albicans</i> 31s	10,450	3,850	0.0002	63
<i>C. albicans</i> 39s	68,300	30,200	0.0008	56
<i>C. albicans</i> 9	37,300	5,400	0.0002	86
<i>C. albicans</i> 14	68,000	32,000	0.001	53

Fonte: Autores.

Na Tabela 2, houve diferença estatisticamente significativa na redução de UFC/mL nas *cepas de C. tropicalis* (p=0,0002), *C. novyensis* (p=0,0002) e *C. glabrata* (p=0,0002), enquanto as demais cepas apresentaram pouca redução em relação ao grupo controle. A cepa *C. glabrata* 45 não apresentou redução em relação ao grupo não tratado, e *C. krusei* também não apresentou diferença estatisticamente significativa (p=0,0082). A redução percentual média para todas as cepas foi de 48,5%, indicando que as cepas não-albicans foram mais resistentes no biofilme tratado com chá verde do que as cepas de *C. albicans*. A diferença na redução de UFC/mL entre *C. albicans* e não-albicans foi de 10,7%.

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias (UFC/mL), valores de p e redução percentual obtidos das 10 cepas de *Candida não-albicans* tratada com NaCl 0,85% (Controle) ou extrato de chá verde 20%.

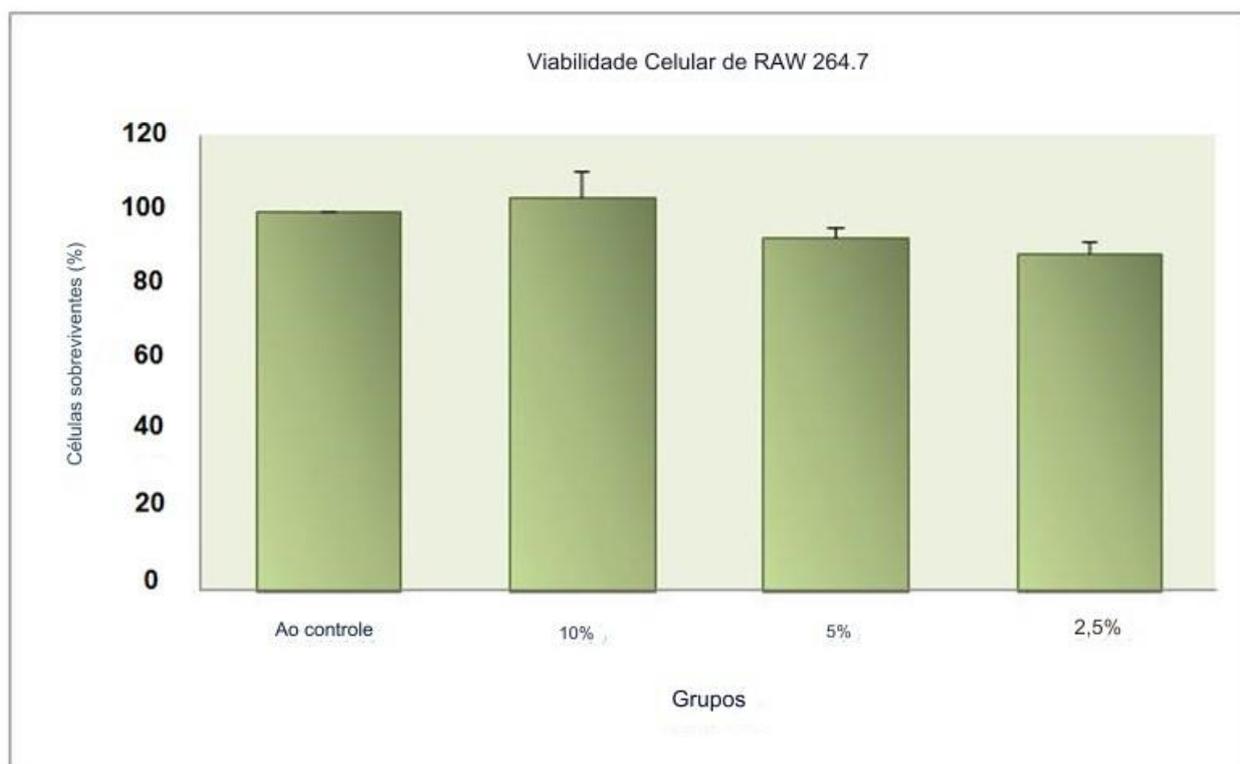
Coar	UFC/mL		p-valor	Redução (%)
	Controle	<i>C. sinensis</i> (chá verde)		
<i>C. dubliniensis</i>	12,150	7,500	0.1859	38
<i>C. glabrata 45</i>	32,400	18,400	0.1618	43
<i>C. glabrata 43</i>	60,400	28,800	0.0002	52
<i>C. glabrata 12°</i>	60,800	46,000	0.0139	24
<i>C. glabrata 46</i>	51,200	38,000	0.0017	26
<i>C. glabrata 51</i>	20,100	6,900	0.0257	66
<i>C. glabrata 67</i>	60,400	28,800	0.0002	52
<i>C. krusei 62</i>	53,400	48,800	0.0082	9
<i>C. novyensis 51s</i>	52,400	23,600	0.0002	55
<i>C. novyensis 52s</i>	18,550	4,300	0.0002	77
<i>C. tropicalis 11</i>	38,400	5,450	0.0002	86
<i>C. tropicalis 12</i>	12,700	5,680	0.0002	55

Fonte: Autores.

3.3 CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *C. SINENSIS* (CHÁ VERDE)

As concentrações de extrato de chá verde (10%, 5% e 2,5%) foram analisadas em RAW 264.7 (macrófagos de camundongo). Observou-se diferença estatística nas médias das concentrações. De acordo com os resultados obtidos, as células submetidas ao extrato de chá verde apresentaram viabilidade em todas as concentrações analisadas. A viabilidade da concentração de 10% (104%) apresentou diferença estatística em relação à concentração de 2,5% (89%). Estes dados demonstram que o extrato de *C. sinensis* não apresentou citotoxicidade celular nas concentrações analisadas e estão expressos na Figura 1.

Figura 1 - Valores médios de viabilidade celular da RAW 264,7 dos grupos avaliados pelo MTT, após exposição a *Extrato de C. sinensis* (chá verde) nas concentrações de 2,5%, 5% e 10%.



Fonte: Autores.

Na Figura 1, observamos que o extrato de *C. sinensis* não apresentou citotoxicidade celular nas concentrações analisadas, sugerindo ser seguro para uso contínuo.

3.4 SENSIBILIDADES ANTIFÚNGICAS

Observou-se neste estudo que todas as cepas de *C. albicans* avaliadas na CIM fluconazol apresentaram suscetibilidade nas concentrações testadas (0,25 a 32 $\mu\text{g/mL}$), não sendo observada resistência nas cepas estudadas. Os valores das concentrações dos antifúngicos estudados variaram de 0,5 a 32 $\mu\text{g/mL}$, e observou-se que não houve resistência entre as diversas cepas e espécies de *Candida* analisadas. As cepas de *C. albicans* foram sensíveis à anfotericina B nas concentrações de 0,5 a 2 $\mu\text{g/mL}$, porém resistência microbiana foi observada nas concentrações de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$ em duas cepas.

Os resultados da CIM da anfotericina B demonstraram que algumas espécies não-albicans foram resistentes aos antifúngicos analisados, sendo cinco cepas resistentes (4 a 8 $\mu\text{g/mL}$) a esse antifúngico.

4 DISCUSSÃO

são fungos oportunistas responsáveis por infecções em vários locais do corpo, sendo a cavidade oral o local preferido para o desenvolvimento dessas doenças (Jorge et al., 1997; Appleton, 2000; Wang, 2015). A candidíase oral é uma infecção localizada frequentemente encontrada em pacientes

imunocomprometidos, como indivíduos HIV positivos, que apresentam uma resposta imune deficiente, o que pode levar à infecção sistêmica (Hospental et al., 2006; Matsuki et al., 2006). O patógeno mais comum isolado de lesões orais em pacientes imunocomprometidos é *C. albicans*, no entanto, a proporção de candidemias por espécies *não-albicans* tem aumentado consideravelmente, com *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* sendo espécies emergentes (Samaranayake et al., 2001; Kromery, 2002; Aquino et al., 2005). De todas as espécies analisadas neste estudo, *C. glabrata* foi a espécie *não-albicans* mais prevalente, totalizando 80% dos isolados estudados, sendo as infecções por *C. glabrata* frequentemente associadas a pacientes HIV positivos.

No presente estudo, foram analisadas 22 cepas clínicas isoladas da cavidade oral de pacientes HIV positivos, obtidas de estudo anterior. Essas cepas foram inicialmente identificadas morfológicamente em meio CHROMagar Candida, que presumivelmente identifica espécies pela coloração da colônia. Foram encontradas colônias verdes sugestivas de *C. albicans*, rosas para *C. krusei* e cinza-azuladas para *C. tropicalis*. Dez espécies de *C. albicans* e 12 *não-albicans* foram identificadas, incluindo *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. novergensis*. A confirmação das espécies foi realizada utilizando o sistema de identificação bioquímica API 20AUX, confirmando os dados obtidos com o meio cromogênico. Assim, um número proporcional de espécies foi encontrado, incluindo *C. dubliniensis*, um patógeno fenotipicamente semelhante a *C. albicans*, e *C. novergensis*, leveduras consideradas emergentes em pacientes HIV positivos. Esses dados são consistentes com vários estudos na literatura, que consideram outras espécies de *Candida* como contribuintes para o processo de infecção da cavidade oral, sendo os isolados *não-albicans* equivalentes em número às espécies predominantes (Panackal et al., 2006; Shivaprakasha et al., 2007; Coco et al., 2008). As condições odontológicas são, em sua maioria, de origem microbiana e têm sido tratadas com fitoterapia, empregada como terapia adjuvante aos tratamentos convencionais (Pereira, 2009; Oliveira et al., 2013).

A atividade antimicrobiana do chá verde já foi estudada e, de acordo com esses estudos, além de todos os benefícios encontrados nessa planta, o efeito microbicida também é considerável (Miller-Hamilton, 1995; Nakata et al., 2007; Setheequ, 2009). Em nosso estudo, o objetivo foi avaliar o efeito fungicida do chá verde a 20%, porém, para ensaios de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima, o extrato foi diluído em meio de cultura RPMI na proporção de 50%, atingindo uma concentração de 10% que foi analisada em cepas clínicas de *C. albicans* e *não-albicans* na forma planctônica. Os resultados mostraram que todas as cepas de *C. albicans* foram suscetíveis ao extrato de chá verde, embora tenham apresentado diferentes padrões de suscetibilidade para CIM (1,25% a 5%) e CFM (2,5% a 10%). Observou-se que as cepas *não-albicans* foram mais resistentes ao extrato do chá verde do que *C. albicans*, com variações na CIM (1,25 a 10%) e na CMF (2,5% a 10%), e as espécies que apresentaram maior resistência foram *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Os biofilmes são considerados uma forma de virulência e resistência microbiana, formados quando uma comunidade microbiana adere e se instala em uma superfície, etapa importante no processo de infecção, apresentando maior resistência a fármacos e defesas imunológicas por não permitir a entrada e o fluxo de fármacos em sua estrutura (Thien et al., 2001; Tsang e Mcmillan, 2007; Hasan et al., 2009). As resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses e aparelhos ortodônticos são locais que favorecem a formação de biofilme na cavidade bucal, principalmente peças submetidas à abrasão mecânica e por vezes não polidas, causando rugosidade que favorece a adesão microbiana e constitui um importante fator etiológico no desenvolvimento da candidíase associada ao uso de próteses (Coco, 2008). Espécimes protéticos de resina acrílica foram utilizados para quantificar a formação de biofilme em UFC/mL. (2009) avaliaram a formação de biofilme por *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* na superfície de discos de titânio, material utilizado para implantes dentários, e relataram que houve adesão nos espécimes analisados, sendo *C. albicans* o microrganismo que mais aderiu à superfície dos implantes. O presente estudo avaliou a atividade antifúngica do extrato de chá verde sobre biofilme aderido a espécimes de resina acrílica, e os resultados obtidos demonstram atividade fungicida com o uso de 20% de chá verde. A maioria das cepas de *C. albicans* estudadas foi suscetível ao tratamento com extrato de chá verde, com exceção de uma cepa de *C. albicans* ($p=0,0754$). Estes dados indicam que *C. sinensis* exibiu efeitos antifúngicos sobre as cepas avaliadas. As espécies *não-albicans*, quando em biofilme, mostraram-se mais resistentes ao extrato do chá verde, com redução percentual média de 48,5%. *C. krusei* ($p=0,0820$), *C. dubliniensis* ($p=0,1859$) e *C. glabrata* ($p=0,1618$) foram as espécies menos suscetíveis em relação ao controle.

Embora muitos fitoterápicos sejam utilizados como tratamentos adjuvantes e alternativos em patologias bucais, além de suas propriedades terapêuticas, a toxicidade dessas substâncias deve ser considerada. No presente estudo, a citotoxicidade do extrato de *C. sinensis* foi avaliada em cultura de macrófagos de camundongos. Três concentrações do extrato, 10%, 5% e 2,5%, foram estudadas, e a viabilidade celular foi de 104%, 93% e 89%, respectivamente. A viabilidade celular foi observada em todas as concentrações de extrato avaliadas, não apresentando citotoxicidade para as células estudadas. Não houve diferença estatística na viabilidade celular após a aplicação do extrato em relação ao controle.

Os frequentes relatos de resistência de espécies de *C. albicans* e não-*albicans* têm sido relacionados à quimioprofilaxia e ao tratamento com antifúngicos, especialmente fluconazol. A eficácia desse medicamento no tratamento da candidíase orofaríngea é atribuída às suas características como baixa toxicidade e amplo espectro de ação, sendo a principal droga de escolha nos tratamentos (Krcmery, 2002; Perea et al., 2002; Aquino et al., 2005; Ramage et al., 2011; Wang, 2015). Os resultados do presente estudo indicaram que isolados de *C. albicans* foram sensíveis ao fluconazol (0,5 a 32 $\mu\text{g/mL}$) em diferentes concentrações. As espécies não-*albicans* analisadas neste estudo também

apresentaram sensibilidade ao fluconazol (0,25 a 32 µg/mL) em diferentes concentrações, e observou-se que as espécies não-albicans foram mais resistentes à anfotericina B do que *C. albicans*. *C. glabrata* (4 a 8 µg/mL), *C. tropicalis* (4 µg/mL) e *C. krusei* (8 µg/mL) foram mais resistentes ao antifúngico avaliado, porém 2 cepas de *C. albicans* (4 a 8 µg/mL) foram resistentes. Atualmente, os antimicrobianos são produzidos industrialmente em grande número para o tratamento de infecções causadas por fungos e bactérias. Os antifúngicos fluconazol e anfotericina B são drogas frequentemente utilizadas no controle de infecções fúngicas, tanto superficiais quanto sistêmicas. Os dados observados neste estudo estão de acordo com a literatura, uma vez que as leveduras estudadas foram suscetíveis aos antifúngicos analisados. Embora o uso de antimicrobianos seja amplamente difundido, o uso de fitoterápicos como alternativa terapêutica ainda é cauteloso, principalmente na odontologia, que visa à segurança do paciente nos tratamentos aplicados à cavidade bucal.

5 CONCLUSÃO

O extrato de chá verde apresentou atividade antifúngica contra as cepas de *Candida* spp., tanto na forma de biofilme quanto planctônica. O fluconazol foi efetivo tanto contra *Candida albicans* quanto contra não-albicans, e o resultado da anfotericina B não foi satisfatório em cepas não-albicans. Não houve citotoxicidade em células de macrófagos expostas ao extrato de *C. sinensis*, no entanto, este estudo não considerou a possibilidade de o extrato causar coloração dentária, uma propriedade comum atribuída ao chá verde. Concluimos que mais estudos são necessários para avaliar tais efeitos colaterais do chá de *C. sinensis*.



REFERÊNCIAS

- Antunes, D. P., Salvia, A. C., Araujo, R. M., Di Nicolo, R., Koga-Ito, C.Y. & Araujo M.A.M. (2010). Effect of green tea extract and mouthwash alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Gerodontology*, 32(4), 291-295. <https://doi:10.11/ger.12132>.
- Appleton, S. S. (2000). Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics and treatment. *Journal of the Californian Dental Association*, 28(12):942-8. ID:11323949.
- Aquino, V. R., Lunard, L. W., Goldani, L. Z. & Barth, A. L. (2005). Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9(5), 411-8. <https://doi:10.1590/s1413.867020050005000009>.
- Blankenship, J.R. & Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 588-94. <https://doi:10.1016/j.mib.2006.10.003>.
- Casaroto, A. R. & Lara, V. S. (2009). Phytomedicines for *Candida* associated denture stomatitis. *Fitoterapia*, 81(5), 323-8. <https://doi:10.1016/j.fitote.2009.12.003>.
- CLSI. Autoverification of Medical Laboratory Results for Specific Disciplines, 1st ed. CLSI guideline AUTO15. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
- Coco, B. J., Cross, L. J., José, A., Cross, J. & Ramage, G. (2008). Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* population associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(5), 377-383. <https://doi:10.1111/j.1399.302x.2008.00439.x>.
- Coleman, D. C., Gary, P. M., Mcmanus, B. A. & Sullivan, D. J. (2010). Mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Future Microbiology*, 5(6), 935-949. <https://doi:10.2217/fmb.10.51>.
- Eick, S., Glockmann, E., Brandl, B. & Pfister, E. W. (2004). Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow systems. *Journal of Oral Rehabilitation*, 31(3), 278-5. <https://doi:10.1046/j.0305.182x.2003.01233.x>.
- Enwuru, C. A., Ogunledun, A., Idika, N., Enwuru, N. V., Ogbonna, F., Aniedobe, M. & Adeiga, A. (2008). Fluconazole resistance opportunistic oro-pharyngeal *Candida* non-*Candida* yeast like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, *Nigéria*. *African Health Sciences*, 8(3)142-8. ID: 2583271.:
- Gulati, M. & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilm: development, regulation and molecular mechanisms. *Microbes Infection*, 18(5), 310-321. <https://doi:10.1016/J.MICINF.2016.01.002>.
- Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N. & Fries, B. C. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infection*, 11(8),753-1. <https://doi:10.1016/j.micinf.2009.04.018>.
- Hospital, D. R., Beckieus, M. L., Floyd, K. L., Horvath, L.L. & Murray, C. K. (2005). Presentive identification of *Candida* species other *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* with the chromogenic medium CHROM-ágar *Candida*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1):1-5. <https://doi:10.1186/1476.0711.5.1>.
- Jorge, A. O. C., Koga-Ito, C. Y., Gonçalves, C. R., Fantinato, V. & Unterkircher, C.S. (1997). Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de

indivíduos controle. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 11(4), 279-285. <https://doi.org/10.1590/S0103-06631997000400009>.

Krcmery, V. & Barnes, A. J. (2002). Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pttogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, 50(4), 243-60. [https://doi: 10.1053/jhin.2001.1151](https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1151).

Perea, S., Ribot, J.L. L., Wickes, B. L., Kirkpatrick, W. R., Dib, O. P. & Bachmanm, S. P. (2002). Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from HIV infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Anti Chemotherapeutic Agents*, 46(6), 1695-703. [https://doi: 10.1128/AAC.46.6.1695-1703.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1695-1703.2002).

Pereira, A. V., Almeida, T. C., Beltrame, F. L., Costa, M. E. & Garrido, L. H. (2009). Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chá verde e preto (*camellia sinensis*). *Acta Scientarium Health Sciences*, 31(2), 119-4. <https://doi.org/10.34119/bjhr2n5-081>.

Panackal, A. A., Gribskov, J. L., Staab, J. F., Kirby, K. A., Rinaldi, M. & Marr, K.A. (2006). Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *Journal Clinical Microbiology*, 44(5), 1740-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1740-1743.2006>

Mollashahi, N. F., Bokaeiam, M., Mollashahi, L. F. & Afrougheh, A. (2015). *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*, 12(8.). PMC:4847165.

Matsuki, M., Kanatsu, H., Watanabe, T., Ogasawara, A., Mikami, T. & Matsumoto, T. (2006). Effects of antifungal drugs on proliferation signals in *Candida albicans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 919. [https://doi.org/ 10.1248/bpb.29.919](https://doi.org/10.1248/bpb.29.919).

Miller-Hamilton, J. M. T. (1995). Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis*). *Anti Chemotherapeutic Agents*, 39(11), 2375-2377. <https://doi.org/10.11/AAC.39.11.2375>.

Nadagir, S. D., Chunchanur, S. K., Halesh, L. H., Yasmeen, K., Chandrasekhar, M. R. & Patil, B. S. (2008). Significance of isolation and drug susceptibility testing of non-*Candida albicans* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *South Asian J Trop Med Public Health*, 39(3), 492-5. ID: 18564689.

Nakata, H. M., Cadillo, E. M., Gastelu, J. V., Sanches, J. B. & Perfecto, D. R. (2007). Efeito antimicrobiano in vitro de la *Camellia sinensis* sobre bactéria orales. *Odontología Sanmarquina*, 10(1), 18-20. <https://doi.org/10.15381/05.v10i1.2898>.

Narotzki, B., Reznick, A. Z., Aizenud, D. & Yishai, L. (2012). Green tea: A promising natural product in oral health. *Archives of Oral Biology*, 57(5), 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.11.07>.

Oliveira, J. R., Castro, V. C., Vilela, P. G. F., Camargo, S. E.A., Carvalho, C. A. T., Jorge, A. O. C. & Oliveira, L. D. (2013). Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *Complementary and Alternative Medicine*, 13, 208. <https://doi.org/10.1186/1472.6882.13.208>.

Ramage, G., Coco, B., Rajedran, R., Rautema, R., Murray, C., Lappin, D. F. & Bagg, J. (2011). Commercial mouthwashes are more effective in vitro. *Oral Surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics*, 8, 205-9. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.10.043>.



Romeiro, R. L., Majewski, M., Molina, F., Junqueira, J. C., Oliveira, L. & Jorge, A. O. C. (2009). Aderência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* à superfície de implantes lisos e rugosos. *Implantnews*, 6(1), 33-37. ID:LiL:523901

Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P., Pow, E. H. N., Beena, V. T. & Yeung, K.W. S. (2001). Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3296-302. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3296.3302.2001>.

Serrano-Granger, C., Cerero-Lapiedra, R., Campo-Trapero, J. & Del RioHighsmith, J. (2005) In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *International Journal of Prosthodontists*, 18(5), 392-8. ID: 162208-4.

Shivaprakasha, S., Radhakrishnan, K. & Karim, P. M. S. (2007). *Candida ssp.* other than *Candida albicans*: a major cause of fungaemia in a tertiary care center. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25(4), 405-7. <https://doi.org/10.4103/0255.0857.37350>.

Sitheequ, M. A. M., Panagoda, G. P., Yau, J., Amarakoun, A. M.T., Udagama, U.R. N. & Samaranayake, L. P. (2009). Antifungal activity of black tea polyphenols against *Candida* species. *Chemotherapy*, 55(3), 189-6. <https://doi.org/10.1159?000216836>.

Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H. & Samaranayake, L. P. (2007). In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52(8), 761-7. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.01.009>.

Tsang, C. S. P. & Mcmillan, A. S. (2007). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clinical Oral Investigations*, 11(4), 361-8. <https://doi.org/10.1007/s00784.007.0122.3>.

Vendruscolo, G. S., Rates, S. M. K. & Mentz, L. A. (2005). Dados farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(4), 361-2. <https://doi.org/10.1590/S0012.695x2005000.40018>.

Wang, Y. (2015). Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*, 6(4), 307-308. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.1000752>.

Wengeter, M. A., Guilhermetti, E., Shinobu, C. S., Takaki, I. & Svidzinski, T. I. E. (2007). Microbiological identification and in vitro sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV positive individuals. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(3), 272-6. <https://doi.org/10.1590/s0037.86822007000300004>.