

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

PROTÁSIO VARGAS NETO

AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINAIS E DA PRÓPOLIS FRENTE A
LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

PONTA GROSSA
2004

PROTÁSIO VARGAS NETO

AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINAIS E DA PRÓPOLIS FRENTE A
LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*, ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de
Ponta Grossa para obtenção do título de mestre no
Curso de Mestrado em Odontologia - Área de
Concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabete Brasil dos Santos.

PONTA GROSSA
2004

Vargas Neto, Protásio
V297 Ação antifúngica de plantas medicinais e da
 própolis
 frente a leveduras do gênero *candida*, isoladas da
 cavidade
 bucal. / Protásio Vargas Neto. Ponta Grossa, 2004.
 98f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora : Prof^a. Dr^a Elizabete Brasil dos Santos

1-Plantas medicinais. 2-*Candida*, 3- própolis, 4- Cavidade
bucal.
I. T.

CDD :

616.969

TERMO DE APROVAÇÃO

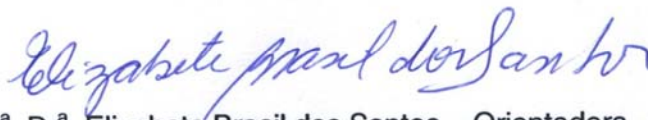
TERMO DE APROVAÇÃO

PROTÁSIO VARGAS NETO

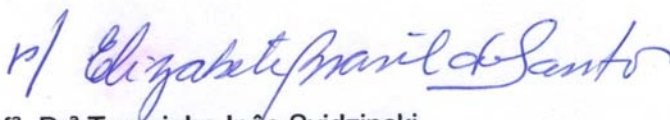
AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINAIS E DA PRÓPOLIS FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*, ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre à Universidade Estadual de Ponta Grossa, Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

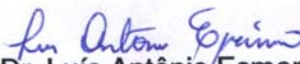
Ponta Grossa, 29 de julho de 2004.



Prof.ª. Dr.ª. Elizabete Brasil dos Santos – Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof.ª. Dr.ª. Terezinha Inês Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Luís Antônio Esmerino
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Luís Antônio Esmerino
Universidade Estadual de Ponta Grossa

***A Vocês que me incentivaram e apoiaram
desde o início, Maria Angela (esposa),
Daniella e Felipe (filhos), o meu amor..***

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Elizabete Brasil dos Santos, que com seu grande conhecimento, compreensão e boa vontade dedicou-se à orientação deste trabalho. Não somente sua competência mas também sua figura humana nos ajudaram muito.

Ao Professor Doutor João Carlos Gomes, cujo incentivo e amizade sempre estiveram presentes quando precisamos.

Ao Professor Doutor Fábio André dos Santos, quando algumas situações pareceram insolúveis, sua competência e compreensão das dificuldades sempre nos ajudaram.

OUTROS AGRADECIMENTOS

Ao Pró-Reitor de Administração Dr. Carlos Luciano Sant'Ana Vargas, por sua colaboração sempre que necessária.

A você Elaine Cristina de Souza, que muito fez para este trabalho.

Aos funcionários Morgana das Graças Procz dos Santos e Celso Bilynkievycz dos Santos , sempre prontos a ajudar.

Ao Doutor Mario de Montemor, sua ajuda nos foi muito importante.

A Mestre Maria Luzia Fernandes Bertholino, Diretora da BICEN, que usou de suas horas de lazer para nos auxiliar.

Ao chefe da DIMAPA José Vinícius Volpi, resolvendo as situações complicadas com amizade e presteza.

Aqueles que comigo fizeram este Mestrado mais que colegas, se tornaram amigos: Andréa Maria de Sousa, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Leyla Antoinette Delgado Cotrina, Adriana de Oliveira Silva, Adriana Postiglione Bühner Samra, Ana Cláudia Rodrigues Chibinski, Flávia Tanaka, Carlos Antonio Pelissari, Douglas Augusto Roderjan, Milko Javier Villarroel Cortés, João Paulo Filgueiras Ribeiro, Edison do Rocio Meister e Alfredo Adimari Júnior.

RESUMO

A Candidose é uma infecção de ocorrência comum na cavidade bucal, consequência de parasitismo temporário por leveduras do gênero *Candida*. Nesta pesquisa, foram coletadas amostras de saliva de 86 pacientes, 40 do sexo masculino e 46 do sexo feminino, com idade entre 18 e 82 anos, sem candidose clinicamente visível. Destes 86 pacientes 38 (44,18%) foram positivos para *Candida*, sendo 20 (23,25%) homens e 18 (20,93%) mulheres. Foram isoladas 38 amostras de 6 espécies, 18 caracterizadas como *C. albicans*, 13 *C. tropicalis*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. guilliermondii*, 1 *C. krusei* e *C. kefyr*. Foi avaliada a sensibilidade destas cepas de *Candida* frente a três fitoterápicos; *Anacardium occidentale*, *Arctium lappa*, *Plantago major* e o produto natural própolis, através de dois testes *in vitro* e dois *in vivo*. Os testes *in vitro* foram o teste de difusão em agar e o teste em tubo de ensaio para determinar o número de células sensíveis aos extratos. Os testes *in vivo* foram de recuperação de *Candida* da boca de ratos e desenvolvimento de candidose na língua de ratos. Como comparação foram também realizados dois testes de sensibilidade aos antifúngicos comerciais, o teste de difusão em ágar com discos impregnados em antifúngicos da Cecon Ltda (antifungigrama) e o teste da ATB Fungus (bioMérieux). Os resultados mostraram uma efetiva ação da própolis tanto nos testes *in vivo* quanto *in vitro*. O fitoterápico mais efetivo frente às amostras de *Candida* foi o cajueiro. A bardana e a tanchagem apresentaram menor ação sobre as leveduras e não mostraram diferenças significativas entre si.

Palavras-chave: plantas medicinais, *Candida*, cavidade bucal, própolis

ABSTRACT

Candidosis is a current intraoral infection, resulting from temporary parasitism of *Candida*, mostly *C. albicans*. The use of phytotherapies for prevention and control of candidosis is not well established. The presence of *Candida* was determined in the oral cavity of 86 patients, 40 males and 46 females, aging from 18 to 82 years, without clinical signs of candidosis by plating saliva samples on sabouraud dextrose. *Candida* was found in 38 (44,18%) individuals, 20 (23,25%) male and 18 (20,93%) female. From 38 samples, 18 were *C. albicans*, 13 *C. tropicalis*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. guilliermondii*, 1 *C. Krusei* and 1 *C. kerfyr*. The sensitivity of these *Candida* isolates were evaluated through three phytotherapies, *Anacardium occidentale*, *Arctium lappa*, *Plantago major* and the natural product propolis. The sensitivity of the yeasts was demonstrated *in vitro*, using a test of diffusion in agar and a test in tube to determine the number of yeasts killed by the phytotherapies and *in vivo* by the recovery of *Candida* from the oral cavity of rats treated with them and by the induction of candidosis in the rat's tongue. As a comparison, tests with two types of commercial antifungal agents were performed. The results showed an effective action of propolis in both *in vivo* and *in vitro* tests. The most effective phytotherapeutic was the cajueiro (*Anacardium occidentale*). Bardana (*Arctium lappa*) and tanchagem (*Plantago major*) showed less effectiveness without statistical significance.

Key-words: phytotherapies, oral cavity, *Candida*, propolis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Anacardium occidentale</i> (cajueiro).....	34
Figura 2 -	<i>Arctium lappa</i> (bardana).....	34
Figura 3 -	<i>Plantago major</i> (tanchagem).....	34
Figura 4 -	Própolis bruta.....	34
Figura 5 -	Extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis de uso comercial, utilizados no experimento.....	40
Figura 6 -	A -Inoculação de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal dos ratos; B- Transferência do "swab" para o tubo de ensaio contendo solução fisiológica, após recuperação da levedura; C- Diluição da amostra; D- Semeadura em ágar Sabouraud Dextrose; E - contagem do número e ufc/mL de <i>C. albicans</i> recuperado da cavidade bucal dos animais.....	44
Figura 7 -	Antifúngicos comerciais utilizados no experimento do teste de difusão em ágar.....	47
Figura 8 -	Sistema ATB FUNGUS - A- ATB - MÉDIUM: meio de preparo da suspensão de <i>Candida</i> ; B -ATB - BUFFER: solução tampão; C - Galeria de antifúngicos em diferentes concentrações.....	48
Figura 9 -	Sistema ATB FUNGUS: Pipetador automático e densitômetro para padronização da suspensão de <i>Candida</i>	49
Figura 10 -	Sistema ATB FUNGUS : Leitor da galeria de antibióticos e software (bioMeriéux) para o teste.....	49
Figura 11 -	Halo de inibição de crescimento produzido pela própolis frente a amostra de <i>C. albicans</i>	56
Figura 12 -	Halos de inibição produzidos pelos extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis frente à amostra de <i>C. albicans</i> (A) e <i>C. parapsilosis</i> (B).....	57
Figura 13 -	Efeito bactericida sobre <i>C. albicans</i> após 10 minutos em contato com os extratos de cajueiro (A) bardana (B), tanchagem (C) e própolis (D), quando comparados com o controle (E).....	58
Figura 14 -	Área de candidose observada na região das papilas cônicas simples de um animal controle, onde se observa a presença de hifas no interior da camada de queratina.400X.....	60
Figura 15 -	Presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com formação de microabscesso intraepitelial sem a presença de hifas de <i>C. albicans</i> , na região das papilas cônicas simples de rato controle. 400X.....	61
Figura 16 -	Halos de inibição de crescimento observado em antifungigrama com discos de papel realizado nas amostras de <i>C. albicans</i> (A), <i>C. tropicalis</i> (B) e <i>C. guilliermondii</i> (C).....	63
Figura 17 -	Galeria ATB-FUNGUS com amostra de <i>Candida</i> semeada para incubação e teste frente aos antifúngicos.....	64
Figura 18 -	Galeria ATB-FUNGUS após incubação mostrando a resistência de <i>C. tropicalis</i> a dois antifúngicos, como mostrado na tabela 10.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Halos de inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> frente ao extrato de cajueiro	52
Gráfico 2	- Halos de inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> frente ao extrato de bardana.....	53
Gráfico 3	- Halos de inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> frente ao extrato de tanchagem.....	54
Gráfico 4	- Halos de inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> frente ao extrato de própolis.....	55
Gráfico 5	- ufc x 10 ³ /mL com as diferenças entre substâncias e inoculações (Média e Erro padrão).....	68
Gráfico 6	- Escores dos halos de inibição par <i>C albicans</i>	69
Gráfico 7	- Escores dos halos de inibição par <i>C albicans</i> 2.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição das características dos fitoterápicos testados frente às amostras de <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal.....	40
Tabela 2 -	Número de amostras de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. Kerfy</i> que apresentaram sensibilidade ao extrato de cajueiro.....	51
Tabela 3 -	Número de amostras de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> que apresentaram sensibilidade ao extrato de bardana.....	53
Tabela 4 -	Número de amostras de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> que apresentaram sensibilidade ao extrato de tanchagem.	54
Tabela 5 -	Número de amostras de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i> que apresentaram sensibilidade ao extrato de própolis.....	55
Tabela 6 -	Número e porcentagem de amostras sensíveis aos extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis e média do diâmetro (em mm) dos halos de inibição do crescimento das espécies de <i>Candida</i> testadas.....	56
Tabela 7 -	Efeito bactericida de extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis frente a amostras de <i>Candida</i>	58
Tabela 8 -	Média e desvio padrão do número de ufc/mL de <i>C. albicans</i> recuperado da cavidade bucal dos ratos 24h após 3 inoculações da levedura.....	59
Tabela 9 -	Média e desvio padrão do número de ufc/mL de <i>C. albicans</i> recuperado da cavidade bucal dos ratos 24h após inoculação única da levedura.....	59
Tabela 10 -	Diâmetro dos halos de inibição de crescimento produzido pelos antifúngicos testados frente a amostras de <i>Candida</i>	62
Tabela 11 -	Sensibilidade das amostras de <i>Candida</i> aos antifúngicos testados no teste ATB-Fungus.....	64
Tabela 12 -	Teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para a recuperação de ufc/10 ³ mL nos grupos.....	67
Tabela 13 -	Teste de equivalência das variâncias (Levene) para a recuperação de ufc/10 ³ mL nos grupos.....	67
Tabela 14 -	Análise de variância – dois critérios. ufc10 ³ /mL.....	67
Tabela 15 -	Comparações múltiplas de Tukey – Fator substâncias.....	68
Tabela 16 -	Postos médios para os escores de halo de inibição para <i>C. albicans</i> – a Teste de kruskal-Wallis.....	69
Tabela 17 -	Diferenças entre os grupos – Comparações múltiplas de Dunn..	69
Tabela 18 -	Postos médios para os escores de halo de inibição para <i>C. albicans</i> 2 – a Teste de kruskal-Wallis.....	70
Tabela 19	Diferenças entre os grupos – Comparações múltiplas de Dunn..	70

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO.....	14
2-	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1-	Gênero <i>Candida</i>	16
2.1.1-	Candidose bucal.....	17
2.2-	Ação Antimicrobiana de Fitoterápicos.....	23
2.2.1-	<i>Anacardium occidentale</i> (cajuero)	27
2.2.2-	<i>Arctium lappa</i> (bardana)	29
2.2.3-	<i>Plantago sp</i> (tanchagem)	30
2.2.4-	Própolis.....	32
3-	PROPOSIÇÃO.....	35
4-	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1-	Coleta de Saliva e Isolamento de <i>Candida</i>	36
4.2-	Identificação das Espécies de <i>Candida</i>	37
4.2.1-	Formação do tubo germinativo.....	37
4.2.2-	Microcultivo em ágar fubá.....	37
4.2.3-	Fermentação de carboidratos.....	38
4.2.4-	Assimilação de carboidratos.....	38
4.2.5-	Interpretação dos testes para identificação das espécies de <i>Candida</i>	39
4.3-	Manipulação dos Fitoterápicos.....	39
4.4-	Sensibilidade dos Isolados de <i>Candida</i> aos fitoterápicos.....	41
4.4.1-	Testes realizados para determinação da sensibilidade de <i>Candida</i> aos fitoterápicos.....	41
4.5-	Sensibilidade de <i>Candida</i> a Antifúngicos Comerciais.....	45
4.5.1-	Testes realizados.....	45
4.5.2-	Preparação do inóculo.....	47
4.5.3-	Inoculação da galeria.....	47
4.5.4-	Leitura da galeria e interpretação.....	47
5-	RESULTADOS.....	50
5.1-	Coleta de Saliva e Isolamento de <i>Candida</i>	50
5.2-	Identificação das Espécies de <i>Candida</i>	50
5.3-	Sensibilidade dos Isolados de <i>Candida</i> aos Fitoterápicos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>).....	50
5.3.1-	Cajuero.....	51
5.3.2-	Bardana.....	52
5.3.3-	Tanchagem.....	53
5.3.4-	Própolis.....	54
5.4-	Sensibilidade dos Isolados de <i>Candida</i> aos Antifúngicos Comerciais (Antifungigrama).....	62
5.5-	Análise Estatística.....	66
6-	DISCUSSÃO.....	71

7- CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A - Termo de Consentimento	82
ANEXO B - Meios de Cultura - Ágar Fubá.....	84
ANEXO C - Prova de Assimilação de Carboidratos.....	87
ANEXO D - Certificados de Análise dos Produtos Utilizados.....	88
ANEXO E - Tabela CECON-Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda.....	93
ANEXO F - ATB Fungus.....	95
ANEXO G - Declaração da Propesp quanto à Pesquisa.....	97

1 INTRODUÇÃO

Como toda especialidade da Odontologia, a Ortodontia tem evoluído sensivelmente nas últimas décadas, não apenas no aspecto do planejamento, tipos de fios, braquetes e bandas, como também nos materiais usados para a fixação desses acessórios aos elementos dentais envolvidos no tratamento ortodôntico.

Historicamente a Ortodontia utilizava bandas de ouro, posteriormente foram substituídas por bandas de aço, que eram fabricadas pelo próprio profissional, as quais evoluíram e passaram a ser pré-fabricadas e comercializadas (NEWMANN, 1969). Essas bandas apresentavam desvantagens tanto na adaptação como também na fixação pois eram cimentadas com cimento de fosfato de zinco ou o cimento de policarboxilato de zinco, dificultando a sua remoção para a verificação de lesões de cáries.

Devido a essas desvantagens a técnica de multibandas foi abandonada com o surgimento dos braquetes com bases apropriadas para serem colados diretamente sobre o esmalte dentário. A colagem direta de braquetes foi introduzida por Newman (1968), baseado no estudo pioneiro de Buonocore (1955) que preconizava o condicionamento do esmalte com ácido fosfórico.

As vantagens da colagem dos acessórios ortodônticos comparadas com a técnica de multibandagens são significativas e dentre elas pode-se citar: melhor estética, não apresentar espaços a serem fechados no final do tratamento, melhor acesso para higienização, diagnosticar com facilidade cáries proximais e menor agressão ao periodonto. (BOYD, 1982).

A técnica do condicionamento ácido tornou-se um procedimento rotineiro, mas sujeito a variáveis que influem diretamente no resultado da adesão, como o tipo e a

concentração do ácido, o tempo de condicionamento, o tipo de resina composta usada, característica dos braquetes e da estrutura do esmalte segundo Gwinnett (1971).

Desde os primeiros estudos de Newmann (1969) sempre houve a busca por um material adesivo ideal, com força de adesão suficiente para resistir às forças decorrentes da mastigação e às forças aplicadas durante a movimentação ortodôntica. Ainda não devem ser tóxicos, ter tempo de trabalho compatível com as necessidades clínicas, ter coeficiente de expansão térmica semelhante ao dente, não danificar a superfície dentária, ser insolúvel aos fluidos bucais, não sofrer alteração de cor e permitir a remoção do aparelho sem provocar danos ao esmalte.

Os estudos de adesividade de Zachrisson (1977) que iniciaram com o cimento de carboxilato de zinco, aproveitando a sua propriedade parcial de adesividade ao esmalte dentário e ao metal, após surgiram as resinas acrílicas e epóxis, mas a partir de 1970 consolidaram-se as resinas compostas (BIS-GMA ou resina de Bowen) e, atualmente, o profissional tem disponível para uso resinas adesivas com boa força de adesão e estabilidade dimensional clinicamente satisfatória.

Em decorrência do aparecimento de lesões cariosas associadas à colocação dos acessórios ortodônticos, buscou-se o desenvolvimento de novos materiais adesivos com propriedades cariostáticas, como o cimento de ionômero com a sua comprovada capacidade de adesão química ao esmalte dentário, liberação e recarga de flúor. Com a mesma finalidade surgiram as resinas compostas com flúor, com o objetivo de associar as boas propriedades mecânicas dos compósitos, com a ação preventiva do flúor Underwood, Rawls e Zimmerman, (1989).

Com o intuito de produzir materiais adesivos melhores, foram desenvolvidos os híbridos de ionômero de vidro/resina composta, os quais são uma tentativa de se combinar a adesão química e o potencial cariostático dos ionômeros, com resistência mecânica muito próxima a das resinas (CORDEIRO, et al 1999).

Outro fator importante na adesão que deve ser considerado são os tipos de braquetes e seus respectivos tipos de base, onde os pesquisadores buscaram definir qual o melhor material para a confecção da base desses acessórios, os quais são colados diretamente à superfície dental (SANTOS, 2000).

Pode-se encontrar quatro tipos de base: 1) plástica; 2) plástica com reforço metálico; 3) metálicas e 4) cerâmicas, os quais foram estudados por alguns autores Miura et al (1971), Retief (1973) e Buzzita et al. (1982), os quais concluíram que as metálicas são as que oferecem maior segurança no contexto geral do tratamento, apesar do fator anti-estético. Com a preocupação de aprimorar a estética dos braquetes metálicos, há uma tendência contínua em se reduzir a dimensão da sua base, o que está sendo possível graças ao melhoramento dos adesivos.

Vários são os fatores responsáveis pela adesão, partindo das variações da técnica do condicionamento ácido do esmalte (concentração e tempo), tipos de materiais (resina composta ou híbrido resina/ionômero), tipos de braquetes e a qualidade do esmalte dentário.

Com a constante evolução tecnológica, novas resinas surgiram no final dos anos noventa, conhecidas como resinas pasta única ou *ONE STEP* , as quais não necessitam de manipulação, com apenas uma resina “primer” e a resina composta propriamente dita.

Aplica-se a resina fluida “primer” na superfície do dente condicionado e na superfície do braquete. Intermediariamente coloca-se a resina composta que irá

realizar uma polimerização química. Essas resinas apresentam as vantagens quanto ao tempo de trabalho clínico e a facilidade técnica de uso. Entretanto a literatura apresenta controvérsias e poucos estudos sobre essas novas resinas pasta única ou *ONE STEP*, portanto, acredita-se ser lícito maiores investigações sobre este tema.

2 PROPOSIÇÃO

O propósito desta pesquisa *in vitro* foi avaliar a resistência adesiva ao cisalhamento da colagem de braquetes específicos para pré-molares, utilizando dois tipos de materiais de colagem direta: A) resina Concise ortodôntico - 3 M (Grupo Controle) e B) resina Ortho-One- Bisco (Grupo Experimental).

1- INTRODUÇÃO

A candidose é uma infecção endógena de ocorrência comum na cavidade bucal, sendo consequência de parasitismo temporário por leveduras do gênero *Candida*. Dentro deste gênero encontramos mais de 200 espécies, sendo que as mais importantes como patógenos humanos são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kruzei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dublinensis* (Cannon et al., 1995 ; Samanarayake ; Samanarayake, 2001). Dentre estas espécies, *C. albicans* merece destaque na micologia médica do ponto de vista etiológico e seu índice de incidência, que varia de 33% a 60% (Jorge et al., 1997 ; Lima et al., 1994). As infecções fúngicas estão cada vez mais prevalentes pelo aumento do número de pacientes com imunossupressão. Doenças crônicas como câncer ou transplantes de medula ou órgãos sólidos; uso prolongado de corticosteróides, infecções por HIV, deixam os pacientes mais suscetíveis à infecções fúngicas oportunistas. Em hospitais, procedimentos cirúrgicos complexos, uso de dispositivos implantáveis e o uso de antibióticos de amplo espectro, aumentam a incidência de infecções fúngicas. Em revisão sobre infecções fúngicas, Keuneth e Rolston (2003), Anderson Câncer Center, Houston, Texas, declarou que as várias espécies de *Candida* são a quarta principal causa de infecções da corrente sanguínea, sendo associadas a uma alta letalidade, de 40%. Na sua forma convencional, o tratamento da candidose consiste no uso de antifúngicos de uso tópico ou sistêmico sendo os derivados poliênicos e azólicos, os mais usados (COSTA, 1999), porém a possibilidade de efeitos colaterais principalmente em pacientes imunodeprimidos deve ser considerada (LAGUNA et al., 1996).

O uso de plantas medicinais vem dos primórdios da medicina, papiro de Ebers XVIII Dinastia egípcia. No Brasil este uso data do século XVI, quando Gabriel Soares de Souza autor do Tratado Descritivo do Brasil de 1587, denominava os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Muito se tem pesquisado em relação às plantas medicinais e seu uso terapêutico. Estes números estão crescendo ainda mais, tendo em vista nossa enorme biodiversidade. Tendo isto em vista nos propusemos a estudar as ações terapêuticas do cajueiro (*Anacardium occidentale*), bardana (*Arctium lappa*), tanchagem (*Plantago major*) e da própolis em relação a *Candida* isolada da cavidade bucal.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Gênero *Candida*

Dentro do gênero *Candida*, encontram-se cerca de 200 espécies, sendo que as mais importantes como patógenos humanos são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dublinensis* (CANNON et al., 1995; SAMARANAYAKE ; SAMARANAYAKE, 2001). Dentre essas espécies, *C. albicans* merece destaque na micologia médica por sua alta patogenicidade.

Espécies de *Candida* fazem parte da microbiota normal do homem e podem ser encontradas na orofaringe, boca, secreção brônquica, dobras da pele e vagina de 60 a 70% da população adulta jovem sadia (STENDERUP, 1990).

Candida são fungos imperfeitos, da classe dos *Deuteromycetes* que podem ser encontrados na forma de leveduras e hifas (FARAH et al., 2000). Na forma de leveduras apresentam-se como organismos eucarióticos, unicelulares, com morfologia variando entre ovóide, redonda, cilíndrica, alongada e apiculada, medindo aproximadamente 2 a 8µm de largura por 3 a 14 µm de comprimento. Hifas são filamentos lineares contendo múltiplas unidades celulares divididas por septos (WEBB et al., 1998). São microrganismos Gram positivos, cultivados em aerobiose, mas podendo crescer em anaerobiose (MEYER, 1987). São cultivadas em agar Sabouraud dextrose, apresentando-se como colônias brancas ou branco-amareladas, com diâmetro entre 4 e 8 mm, úmidas, cremosas e com odor característico. *C. albicans* para passar da forma leveduriforme para a forma de hifas requer um estágio nutritivo apropriado, fatores indutores, temperatura maior que 33°C e pH próximo ao neutro (SAMARANAYAKE ; McFARLANE, 1990).

Lacaz (1980) demonstrou que na forma leveduriforme, *C. albicans* é constituída quimicamente de 60% de polissacarídeos, 13% de proteínas, 8.5% de lipídios e 18.5% de compostos inertes, enquanto que nas hifas observou-se uma quantidade de quitina 3 vezes maior e também maior quantidade de proteína.

A identificação das espécies de *Candida* é feita através do microcultivo em ágar fubá, onde se observa a formação de estruturas globosas denominadas clamidoconídio ou clamidósporos; formação de tubo germinativo após inoculação em soro estéril a 37°C; fermentação e assimilação de açúcares como glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose, rafinose e outros (LACAZ, 1998). Meios cromógenos também são utilizados pra identificação de espécies de *Candida*. Em ágar CHROM, *C. albicans* apresenta colônias verdes; *C. tropicalis* colônias azuis; *C. krusei*, rosa pálido; e *C. glabrata*, colônias roxas (WILLIAMS ; LEWIS, 2000).

2.1.1- Candidose bucal

Candidose bucal é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans*. Outras espécies estão freqüentemente relacionadas ao desenvolvimento de candidoses, na maioria dos casos em indivíduos imunocomprometidos. A capacidade de *Candida* causar infecção está relacionada ao estado geral de saúde do hospedeiro ou à presença de fatores predisponentes, locais ou sistêmicos. Assim, a virulência de *Candida* é determinada mais pelo hospedeiro que por fatores inerentes à própria levedura (ALLEN, 1992 ; BUDTZ-JORGENSEN, 1990).

Os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* não estão completamente esclarecidos, pois dependem do tipo e local de infecção, estágio de invasão e resposta do hospedeiro (HAYNES, 2001). Vários fatores têm sido implicados na patogenicidade de *Candida*. Entre estes fatores podemos citar a capacidade de aderência à mucosa, habilidade em formar tubo germinativo e hifas, produção de enzimas histolíticas e toxinas (AKPAN ; MORGAN, 2002).

Um dos passos mais importantes para o desenvolvimento de candidose bucal é a capacidade de aderência das leveduras às células epiteliais. Os mecanismos envolvidos neste processo podem ser a interação entre moléculas de superfície do microrganismo e receptores específicos no hospedeiro; forças eletrostáticas, agregação celular e hidrofobicidade de superfície (COTTER; KAVANAH, 2000; GHANNOUM et al., 1990). A aderência deve-se a moléculas especializadas, chamadas adesinas, que reconhecem estruturas nos tecidos, como proteínas celulares, colágeno, fibrinogênio, fibronectina e laminina (CANNON et al., 1995 ; WEBB et al., 1998). Dentre as adesinas temos glucano, quitina, proteínas da parede celular, lipídios e manoproteínas, sendo essas últimas consideradas as mais importantes (PENDRAK; KLOTZ, 1995). A adesão de *Candida* às células epiteliais ocorre através da porção protéica da manoproteína da levedura e fucose ou N-acetilglicosamina, nas glicoproteínas das células epiteliais (WEBB et al., 1998). A aderência é necessária para a colonização inicial. Sem se aderir, a taxa de crescimento de *C. albicans* é insuficiente para manter o fungo na boca ou trato gastrointestinal.

Macourtie e Douglas (1984) encontraram relação direta entre a composição da superfície celular, aderência e virulência de *C. albicans*. Amostras de *C. albicans* foram capazes de sintetizar uma camada de superfície fibrilar em

resposta às altas concentrações de açúcar no meio e esta modificação resultou no aumento de adesão às células epiteliais e na virulência para camundongos.

Dentre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* possui maior capacidade de aderência às células epiteliais e outras superfícies, o que pode estar diretamente relacionado com sua maior patogenicidade, quando comparada às outras espécies (KIMURA; PEARSAL, 1978).

Outro importante mecanismo de patogenicidade é a formação de tubo germinativo e hifas por *C. albicans*. Estes mecanismos são importantes, uma vez que aumentam a capacidade de aderência das leveduras aos tecidos, acrílico e pele e aumentam a capacidade de invasão no hospedeiro (KIMURA; PEARSAL, 1980); aumentam a resistência à fagócitos devido às dimensões físicas (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001). Martin et al., (1984) verificaram que cepas de *C. albicans* que não formavam tubo germinativo eram incapazes de causar candidose bucal em camundongos enquanto que as amostras produtoras de tubo germinativo causavam lesões com inflamação crônica, invasão dos tecidos por hifas e hiperplasia epitelial.

A produção de enzimas hidrolíticas geralmente contribui para a patogênese de infecções microbianas. *C. albicans* produz um grande número de enzimas, como fosfolipase, lipase, fosfomonoesterase, hexosaminidases e pelo menos 3 proteínas aspárticas. As proteinases são secretadas predominantemente por espécies patogênicas de *Candida*, especialmente *C. albicans* e *C. tropicalis*. A capacidade proteolítica de *C. parapsilosis* é moderada e as demais espécies que são de menor interesse médico não secretam proteinase (CANNON, 1995 ; HOEGL et al., 1996). A fosfolipase também é uma enzima importante para *C. albicans*, pois

catalisa a hidrólise de fosfolipídios que são importantes componentes das membranas celulares (GHANNOUM, 2000 ; LANE; GARCIA, 1991).

A produção de toxina é um importante fator de virulência para *C. albicans*. Iwata (1975) isolou a candidoxina, uma toxina endógena, protéica, que tem ação letal sobre outros fungos e bactérias. O fator *Killer* é uma exotoxina inicialmente observada em *Sacharomyces cereviseae* por Bevan e Makower (1963 apud MAGLIANE et al., 1997) e tem sido usada na diferenciação biológica de leveduras dentro da mesma espécie, podendo ser usado como marcador epidemiológico (BENDOVA, 1986).

Vários são os fatores predisponentes presentes no hospedeiro que favorecem o desenvolvimento de candidose bucal. Estes podem ser locais ou sistêmicos. Dentre os fatores locais, a xerostomia e o uso de antibióticos são considerados os mais importantes, principalmente pela alteração do equilíbrio da microbiota indígena local (FOTOS et al., 1992). Indivíduos xerostômicos apresentam facilidade de implantação de *Candida*. Primeiro porque a limpeza mecânica da boca, exercida pela saliva, está ausente ou diminuída, contribuindo para a presença de maior número de microrganismos na boca e para retenção de alimentos. Além disso, a ausência de substâncias antimicrobianas presentes na saliva como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, comprometem a integridade local. Antibióticos, principalmente de largo espectro, podem impedir ou inibir o desenvolvimento de microrganismos indígenas que atuariam como antagonistas à implantação da levedura, seja por competição por alimentos ou pela aderência à receptores nas células epiteliais que também servem de receptores para a *Candida* (OKSALA, 1990).

Sherman et al. (2002) e Takakura et al. (2003) citam entre os fatores predisponentes a candidose bucal a imunossupressão, distúrbios endócrinos, deficiência nutricional, medicações, doenças malignas, próteses dentárias, alterações epiteliais, mudança quantitativa ou qualitativa da saliva, dieta rica em carboidrato, idade, higiene oral deficiente e tabagismo. Santos et al (1999) estudaram a influência do uso de próteses removíveis na presença de *Candida* na cavidade bucal de adultos e encontraram 88.2% dos usuários de prótese removíveis positivos para *Candida*, sendo que em 17.4% o número de leveduras ultrapassou 400 ufc/mL. Os autores observaram ainda que 91.2% dos pacientes apresentavam higiene bucal e das próteses regular ou deficiente. Ainda Santos et al., (1999) estudando o perfil da população que busca atendimento odontológico universitário, verificaram que o uso de próteses totais ou parciais mal adaptadas e mal higienizadas foi o principal fator predisponente à presença de número elevado de *Candida* na boca.

Candidose é um termo usado para determinar um grupo de doenças resultantes da infecção por *Candida spp* (McINTYRE, 2001). Essas lesões podem variar desde lesões superficiais na mucosa até infecções sistêmicas extremamente graves (WEBB et al., 1998).

Clinicamente, a candidose bucal pode apresentar-se como pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2001). A forma pseudomembranosa caracteriza-se como placas brancas e cremosas aderentes à mucosa bucal que quando removidas pela raspagem expõe uma mucosa adjacente normal ou eritematosa (SHERMAN et al., 2002). Histologicamente a pseudomembrana é formada por tecidos necróticos, restos alimentares, leucócitos e bactérias, juntamente com leveduras e hifas de

Candida, que podem apresentar invasão na camada queratinizada do epitélio. Observa-se ainda acantose, edema e microabscessos intraepiteliais. Infiltrado inflamatório PMN, linfócitos e macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo (FARAH et al., 2000; REICHARD et al., 2000). Os sítios mais freqüentemente atingidos por esse tipo de candidose são o palato mole, orofaringe, dorso da língua, mucosa jugal e gengiva (McINTYRE, 2001). A candidose eritematosa tem sido associada com infecção pelo HIV, representando cerca de 50% das candidoses encontradas nesses pacientes. Ocorrem na maioria dos casos no dorso da língua, ou palato, como áreas avermelhadas de bordas pouco definidas. Histologicamente, o aspecto é semelhante ao observado na pseudomembranosa, entretanto a quantidade de hifas é menor e a reação inflamatória no tecido conjuntivo é mais intensa (BUDTZ-JORGENSEN, 1990).

A forma hiperplásica é uma condição crônica cujo aspecto clínico é caracterizado pela presença de placas brancas que não podem ser removidas pela raspagem. É caracterizada por intensa penetração de hifas na superfície do epitélio, que apresenta hiperplasia e acantose, com reação inflamatória variando de moderada a severa, no tecido conjuntivo subepitelial (NEVILLE et al., 1998 ; REICHARD et al., 2000 ; SHERMAN et al., 2002).

2.2- Ação Antimicrobiana de Fitoterápicos

A procura de plantas com poder curativo para diferentes doenças data de muitos anos. Desde a pré-história até os dias atuais, centenas, senão milhares de plantas têm sido usadas por pessoas de todos os continentes, seja na forma de emplastos, infusões, decocção, e outros. Embora cerca de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ dos fármacos distribuídos nos Estados Unidos tenham origem de plantas superiores, poucos são usados como agentes antimicrobianos, uma vez que bactérias e fungos são as principais fontes desses agentes (COWAN, 1999).

Com o advento dos antibióticos na década de 50, o uso de derivados de plantas como antimicrobianos é quase inexistente. Entretanto, microbiologistas têm pelo menos duas razões para verificar a eficácia antimicrobiana de extratos de plantas medicinais. Primeiro observa-se na literatura que em média, dois ou três antibióticos produzidos por microrganismos são lançados no mercado a cada ano, mostrando que o tempo de vida de qualquer antibiótico é extremamente curto (CLARK, 1996) e que novos agentes antimicrobianos (incluindo vacinas) devem ser pesquisados e dentro dessas novas fontes de pesquisa, encontram-se as plantas. Segundo, a população já está tomando conhecimento dos problemas de prescrição desnecessária e incorreta dos antibióticos tradicionais e querem ter mais autonomia sobre seus cuidados médicos e uma grande quantidade de compostos de plantas são facilmente encontrados no mercado. Na década de 90, aproximadamente $\frac{1}{3}$ da população americana já tinha feito uso de pelo menos um tipo de terapia não convencional (EISENBERG et al., 1993). Neste contexto, o interesse em plantas com propriedades terapêuticas abrangendo aquelas com atividade antimicrobiana tem crescido bastante, não apenas por constituir-se em recurso terapêutico

alternativo, mas ainda devido às perspectivas de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa e menor índice de desvantagens (QUEIROZ, 1998).

As plantas possuem uma infinidade de compostos aromáticos, a maioria deles fenóis e seus derivados. Cerca de 12.000 metabólitos secundários já foram isolados e este número corresponde a apenas 10% do total (SCHULTES, 1978). Dentre os principais grupos de compostos derivados de plantas que apresentam efeito antimicrobiano estão os fenólicos e polifenóis. Estragão e tomilho contêm ácido cafeico, cuja eficácia já foi demonstrada contra vírus, bactéria e fungos (BRANTNER et al., 1996 ; DUKE, 1985). Catecol e pirogalol são compostos hidroxilados com ação antimicrobiana. Um dos mecanismos responsáveis pela toxicidade do fenol para microrganismos é a inibição enzimática pelos compostos oxidados (MASON; WASSERMAN, 1987). Eugenol é um representante dos compostos fenólicos já bem caracterizados. É um óleo essencial encontrado no cravo da Índia, considerado bacteriostático e fungistático (DUKE, 1985 ; THOMSON, 1978).

As plantas constituem uma grande reserva de recursos medicamentosos e os princípios ativos de várias plantas têm sido investigados quanto à ação antimicrobiana. Plantas medicinais, principalmente na América do Sul, constituem a primeira linha no tratamento de várias doenças infecciosas e não infecciosas. Leal-Cardoso e Fonteles (1999) estudaram a ação farmacológica de 15 espécies de plantas aromáticas do nordeste brasileiro. Segundo os autores, os óleos essenciais tiveram efeitos sobre a contração muscular, antiespasmódico, analgésico, antiinflamatório, anticonvulsivante e antibacteriano, validando assim seu uso na medicina popular. Eugenol, obtido da planta *Ocimum gratissimum*, usado na medicina popular brasileira, demonstrou atividade contra bactérias Gram positivas e

negativas. Tradicionalmente é usado para controle de infecções do trato respiratório superior, diarreia, infecções na pele, pneumonia, tosse, febre e conjuntivite (NAKAMURA et al., 1999).

O efeito das quinonas sobre microrganismos é extremamente grande pois estas são uma fonte estável de radicais livres e formam complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos nas proteínas, geralmente levando à quebra da proteína e perda da função. Os possíveis alvos nas células bacterianas são as adesinas e polipeptídios da parede celular e enzimas ligadas à membrana. Kazmi et al (1994) demonstram ação bacteriostática das quinonas para *B. anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* e *P. aeruginosa* e bactericida para *P. pseudomalliae*.

Outro composto fenólico com efeito antimicrobiano são os flavonóides. Estes são sintetizados pelas plantas em resposta a uma infecção microbiana. Sua atividade deve-se provavelmente a sua habilidade de formar complexos com proteínas solúveis e extracelulares e com a parede celular de bactérias. Alguns flavonóides lipofílicos podem também quebrar as membranas bacterianas, como foi demonstrado por Tsuchiya et al. (1994) frente a *Staphylococcus aureus* metilina resistentes. Tanino é o nome de um grupo de substâncias fenólicas poliméricas. As atividades antimicrobianas dos taninos, como das quinonas, devem-se à capacidade de inativar adesinas, enzimas e proteínas de transporte do envelope celular (HASLAN, 1996). Cumarina são substâncias fenólicas com efeito anti-trombótico, antiinflamatório e vasodilatador. Thorne (1997) na busca de agentes para tratamento de candidose vaginal em mulheres grávidas demonstrou o efeito “in vitro” da cumarina contra *C. albicans*.

A fragrância das plantas deve-se aos óleos essenciais ou terpenos. Óleos essenciais ou terpenóides são ativos contra bactérias (AMARAL et al., 1998 ; BARRE et al., 1997) vírus (FUJIOKA; KASHIWADA, 1994) e fungos (AYAFOR et al., 1994 ; KUBO et al., 1993 ; RANA, 1997). Petalotemunol é um terpeno com grande atividade contra bactérias Gram positivas e moderada ou fraca ação contra Gram negativas e contra *Candida* (HUFFORD et al., 1993). Batista et al. (1994) demonstraram a eficácia de dois diterpenos no controle de *Candida albicans*. *C. albicans* também foi sensível ao extrato de *Soanum nigrescens*, demonstrando a mesma sensibilidade que apresenta para nistatina (GIRON et al., 1988).

Queiroz (1998) testaram a ação de extratos e óleos essenciais de *Anacardium occidentale* (cajueiro), *Plectranthus amboinicus* (malva), *Punica granatum* (romã) e *Phithecellobium avaremotemo* (barbatemão) frente a isolados de *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. kruzei* e *C. tropicallis* e observou que todos os extratos e óleo essencial mostraram efeito inibitório frente às leveduras estudadas.

Compostos heterocíclicos de nitrogênio são chamados de alcalóides e o primeiro exemplo de um alcalóide usado como medicamento é a morfina. Apresenta ação antifúngica, antimicrobiana, antiparasitária (COWAN, 1999).

As lectinas e polipeptídios com ação sobre microrganismos foram demonstrados em 1942. Seu mecanismo de ação é provavelmente a formação de canais de íons na membrana do microrganismo ou através da inibição competitiva das proteínas do microrganismo aos receptores polissacarídicos no hospedeiro.

A ascensão do HIV determinou a investigação de derivados de plantas que possam ter eficácia no seu controle, principalmente para o uso em países subdesenvolvidos que têm acesso limitado aos medicamentos atuais (DE

CLERCK, 1995). Alves et al. (2000) verificaram que 42 dentre 60 espécies de plantas medicinais da savana brasileira apresentaram efeitos antimolusco, antifúngica e antibacteriana. Extrato purificado de *Prunela vulgaris* foi capaz de bloquear a transmissão célula-célula do vírus HIV-1, preveniu a formação de sincícios e interferiu na habilidade do HIV-1 e da proteína GP-120 de se ligarem ao receptor CD4. Análise por PCR confirmou a ausência de DNA proviral do HIV-1 em células expostas ao vírus na presença do extrato, sugerindo que o extrato purificado inibe a infecção de células susceptíveis pelo HIV-1, impedindo a adesão do vírus ao receptor CD4 (YAO et al., 1992).

Várias das indicações fitoterápicas são de conhecimento popular e muitas delas tem comprovação científica para seu uso, mesmo assim, a fitoterapia em odontologia ainda é incipiente no contexto da odontologia oficial. Apesar da utilização de produtos naturais como o eugenol, guta percha, timol e outros, todos de origem vegetal, usados na manipulação de alguns materiais dentários, cujas ações bacteriostática e bactericida estão devidamente comprovadas, a fitoterapia em odontologia constitui um tema recente (MATOS, 1994 ; SAMPAIO, 1997).

2.2.1- *Anacardium occidentale* (cajueiro)

Pertencente à família *Anacardiaceae*, o cajueiro, também conhecido por acajuba, acajaíba, caju-manso, cacaju, oacaju e anacardo é uma árvore amazônica que pode atingir até 15m de altura. Tem origem na América do Sul, estando largamente espalhado pela faixa litorânea da região tropical e subtropical do Brasil. Seu principal endemismo encontra-se na região nordeste. Botanicamente, a pseudofruta é um pedúnculo macio que cresce atrás da fruta propriamente dita e serve de suporte para esta; possui uma espessa polpa succulenta que é utilizada

para fabricação de sucos. O verdadeiro fruto, a castanha, cresce na extremidade da pseudofruta ou pedúnculo, é recoberta por duas conchas e entre essas conchas existe óleo tóxico e cáustico espesso chamado cardol, que deve ser removido antes que esta possa ser ingerida. Os princípios ativos do cajueiro podem ser isolados das folhas e casca, onde temos os taninos, gomas, resinas, material corante e saponinas; do pseudofruto pode-se isolar taninos, vitamina C, açúcares fibras e água; da castanha obtém-se ácido anacárdico, anacardol, cardol, taninos e da amêndoa (semente), óleo fixo, proteínas e sais minerais. A atividade antimicrobiana do cajueiro foi documentada pela primeira vez, num estudo *in vitro* de 1982. Akipendu (2001) demonstraram ação antimicrobiana do extrato metanólico da casca do cajueiro frente a 13 de 15 espécies bacterianas isoladas, na concentração de 20mg/mL. Kudi (1999) demonstraram que extratos brutos da casca do cajueiro apresentaram ação antibacteriana, tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Helicobacter pylori* é um microrganismo atualmente relacionado à causa da gastrite aguda. Kubo et al (1993) demonstraram que ácidos anacárdicos e (E)-2 hexenal extraídos do cajueiro possuem atividade anti *Helicobacter pylori* e que estes produtos apresentam capacidade de inibir urease, um mecanismo de virulência desses microrganismos. Os diferentes compostos produzidos a partir do cajueiro apresentam uma ampla gama de aplicação. A casca e a folha do cajueiro são grandes fontes de taninos, um grupo de fitoquímicos com propriedades biológicas bem documentadas. Em países como Brasil e Peru, o chá feito com a casca ou folha do cajueiro é usado em banhos como anti-séptico vaginal. No Brasil a fruta é usada no tratamento de lesões de pele relacionadas à sífilis. Princípios ativos de plantas da medicina popular têm sido investigados. Santos Filho (1990) examinaram a ação antibacteriana de 120

espécies de plantas pertencentes a 28 famílias, dentre elas *Anacardiaceae* e demonstraram ação dessa espécie no controle de microrganismos.

2.2.2 *Arctium lappa* (bardana)

A bardana, pertencente à família *Compositae*, é comumente usada na medicina popular no tratamento de distúrbios sanguíneos, circulatórios, digestivos, imunes, nos rins, fígado e pulmões. Possui ação antibiótica, antifúngica, anti-séptica e anti-tumoral (BLANCO, 2003).

Apresenta como princípios ativos óleo essencial até 0,2%, polifenóis, inulina 40 a 50%, mucilagens, lapatina, taninos, sais minerais, princípio antibiótico, ácido clorogênico, vitaminas do grupo B e A, fuquinona, glicosídeos, resina, cálcio, potássio, magnésio, princípio amargo. Conhecida desde a antiguidade na medicina caseira, nunca tendo sido contestada ao longo dos séculos. As raízes e as folhas tenras podem ser utilizadas como alimento, podendo a raiz também ser consumida crua. Na Europa as folhas e brotos novos são consumidos como verdura e no Japão é cultivada uma variedade para produção de raízes comestíveis. No Brasil tem um crescimento vigoroso, sendo considerada uma espécie daninha em pomares e terrenos baldios no sul do Brasil. Antigamente era utilizada em mistura com outras ervas, para clarear a pele, a bardana tem hoje aplicações como depurativo e cicatrizante (BLANCO, 2003).

O decocto de suas raízes é eficaz, como purificador do sangue, em doenças reumáticas, afecções renais e distúrbios digestivos. Externamente, prepara-se com elas uma pomada para eczema e uma loção para evitar a queda de cabelo. Do ponto de vista nutricional, esta raiz apresenta boas qualidades: fornece proteínas, glicídios, fibras, cálcio, fósforo, ferro, vitamina A, B1, riboflavina, niacina e

vitamina C. Assim como todas as raízes, a bardana também é rica fonte de sais minerais.

Uma cataplasma das folhas frescas alivia as dores provocadas por picadas de insetos, torções e hemorróidas, e a sua infusão serve para limpar feridas e inflamações cutâneas. O extrato das sementes e também suas infusões ou decocções são especialmente indicados para a cura de enfermidades crônicas da pele. As folhas esmagadas e aplicadas diretamente sobre a epiderme têm uma ação bactericida e antimicótica que a torna um remédio eficaz contra inúmeras doenças de pele, como dermatoses úmidas e purulentas, acnes, eczemas, pruridos, tinha, seborréia da face ou do couro cabeludo e herpes simples. O óleo de bardana é considerado um estimulante capilar.

2.2.3 *Plantago* sp (tanchagem)

Tanchagem pertence à família das plantagináceas, que compreende muitas espécies, cinco das quais são comestíveis: *Plantago maior* L., *Plantago australis* Lam. var *hirtella* (HBK) Banhn, *Plantago guilhemina* Desc., *Plantago catharina* Desc. e *Plantago tomentosa* Engl. Todas elas são conhecidas vulgarmente no Brasil como língua-de-vaca, plantagem, tanchagem ou tansagem. São plantas perenes, de raízes curtas e fibrosas. É uma planta ereta, sem caule, atingindo mais de 40cm de altura. Suas folhas, de formato variado, são agrupadas na base, dotadas de nervuras bem marcadas, com ou sem pelos. Em forma de rosetas, saem diretamente do solo e medem cerca de 20 cm de comprimento. As flores são pequenas, entre esverdeadas e acastanhadas, agrupadas em espigas alongadas, contínuas ou não, providas de um longo eixo. Pode-se observar numa

mesma planta vários eixos com idade e altura diferentes, o que possibilitará mais tarde a existência de sementes se propagando por um período de tempo mais longo do que se todas as espigas se desenvolvessem na mesma época. Os frutos são muitos pequenos, com sementes escuras e achatadas. Como planta de clima temperado, desenvolve-se melhor em solos úmidos e locais frescos e com boa iluminação. *P. major* contém compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, lipídios, derivados de ácido cafeico, flavonóides, iridóides e tepernóides. Também foram isolados alcalóides e alguns ácidos orgânicos (SAMUELSEN, 2000).

Pesquisas com espécie *Plantago australiana* realizadas na Universidade Federal do Paraná comprovaram a presença de aucubina e catalpol, responsáveis pela ação antiinflamatória e antibiótica. Zanon et al. (1999) demonstraram o efeito antiviral de extrato alcoólico de *Plantago brasiliensis* e *Plantago major* contra *Herpes suis vírus*, inibindo 2x mais a infectividade desse vírus. PMII é um polissacarídeo solúvel isolado das folhas de *P. major*. Hertland (1999) induziram infecção sistêmica por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos e demonstraram que este polissacarídeo conferiu proteção contra a infecção quando este foi administrado sistemicamente antes da inoculação do microrganismo e que os efeitos protetores devem-se à estimulação do sistema imune inato e não da resposta adaptativa.

Holetz et al. (2002) verificaram o efeito antibacteriano e antifúngico de 13 extratos de plantas, entre elas o cajueiro e tanchagem, contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, isoladas de pacientes com candidose. Através da técnica de microdiluição em caldo Miller Hinton e determinação da concentração inibitória mínima, verificaram que *Plantago major* demonstrou resposta moderada

contra *C. krusei*, fraca atividade contra *C. tropicalis* e não demonstrou atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Extratos de *Plantago* apresenta uma série de atividades biológicas que incluem cicatrização de feridas, ação antiinflamatória, analgésica, antioxidante, antibiótica, regulatória do sistema imune e atividade antiulcerogênica, o que faz seu uso bastante freqüente na medicina popular (SAMUELSEN, 2000).

2.2.4 Própolis

Própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas (*Apis mellifera* L) e utilizada pela medicina popular devido às propriedades farmacodinâmicas e antimicrobianas (VICENTE; HIROOKA, 1987).

Os componentes químicos da própolis têm sido isolados e analisados em diferentes países, sendo o ácido cafeico, ácido cumárico e flavonoides os possíveis responsáveis pelo poder antibiótico da resina. Pinocembrin, galangin, sakuranetin, kaempferol e ácido hydroxycinamico, isolados e identificados em própolis brasileiras são considerados flavonóides de ação antibiótica.

Essa substância é composta por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis 5% de pólen, sendo identificados ainda ácidos aromáticos insaturados, flavonóides e microelementos. A composição química da própolis varia de acordo com a espécie de abelha, a área geográfica de origem e dos métodos de extração e controle de qualidade do produtor e até da época do ano.

Própolis tem sido utilizada pela população mundial como medicamento alternativo, indiscriminadamente e sem indicação médica. É ainda considerada um cosmético.

A própolis é alvo constante de estudos *in vitro* e *in vivo*, em diversos países, com o objetivo de se obter o máximo de informações, na tentativa de fazer com que a Organização Mundial de Saúde (OMS), bem como os Ministérios de Saúde dos diversos países aprovem a própolis como medicamento.

Segundo Cruz (1992) o extrato alcoólico de própolis apresenta atividade antifúngica na concentração de 1,25g/mL, no entanto, apresenta apenas atividade inibitória parcial para o desenvolvimento de leveduras nas concentrações estudadas 1,25g/mL, 2,5g/mL e 5,0g/mL. Vicente e Hirooka (1987) estudaram a atividade antimicrobiana de própolis frente a *Streptococcus pyogenes*, microrganismos da microbiota bucal e fungos produtores de micotoxinas. Os autores observaram que houve inibição da produção de hemolisina pelo *S. pyogenes* quando semeado em ágar sangue e efeito bactericida da própolis sobre este microrganismo em caldo BHI. Houve ação bacteriostática sobre a microbiota oral e os fungos produtores de micotoxina não foram inibidos pela própolis.

Considerando que a própolis tem um baixo custo e por ser de fácil acesso à população, não existindo contra-indicações quanto ao seu uso terapêutico, ela poderá ser utilizada topicamente em pacientes portadores de candidose. Estudos *in vivo* deverão ser feitos com rigor, considerando a dinâmica do corpo humano como um todo, bem como a interferência de parâmetros sistêmicos na ecologia bucal.



Figura 1- *Anacardium occidentale* (cajueiro)



Figura 2- *Arctium lappa* (bardana)



Figura 3- *Plantago major* (tanchagem)

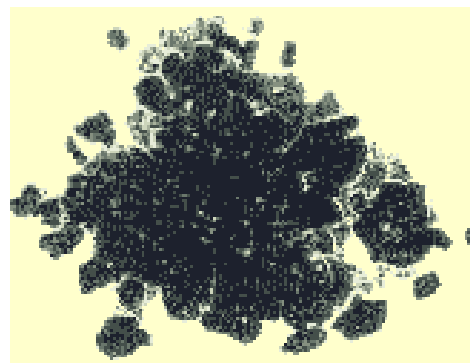


Figura 4- Própolis bruta

3- PROPOSIÇÃO

Propusemo-nos a avaliar a ação antifúngica de três plantas medicinais tradicionalmente usadas na medicina popular e da própolis frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Coleta de Saliva e Isolamento de *Candida*

Foram coletadas amostras de saliva de 86 pacientes, sendo 40 homens e 46 mulheres, com idade entre 18 e 82 anos, que procuraram atendimento nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A saliva foi coletada após o paciente estar ciente dos procedimentos a serem realizados e ter assinado um termo de consentimento (Anexo A). Nenhum paciente apresentava candidose clinicamente.

A saliva foi coletada com “swab” esterilizado, que foi passado por toda a superfície da cavidade bucal, especialmente língua e palato. A seguir o material foi semeado em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose adicionado de 0.1mg de cloranfenicol (Carlo Erba – 0.1mg/mL de meio). As placas foram incubadas a 37°C/48h. Após este período, verificou-se o crescimento de colônias características de *Candida* (colônias esféricas, branco-foscas com aspecto de porcelana e odor característico) que foram confirmadas através de esfregaços corados pelo Gram, onde se observou células Gram positivas, ovaladas, com ou sem brotamento. Uma colônia de *Candida* de cada paciente foi transferida para água destilada esterilizada e estocada para posterior identificação.

4.2 - Identificação das espécies de *Candida*

Para identificação das espécies de *Candida*, as amostras estocadas em água destilada esterilizada foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C/24-48h. A identificação das espécies foi realizada de acordo com o descrito por Samaranayake e MacFarlane, (1990) e Sandvén (1990) com modificações, consistindo nas provas de formação de tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá, fermentação e assimilação de carboidratos.

4.2.1- Formação de tubo germinativo

A formação de tubo germinativo a partir das células leveduriformes foi verificada inoculando-se uma alçada de cultura pura de 24h da levedura em 0.5 mL de soro de coelho estéril em tubo de ensaio. O tubo foi levado ao banho-maria a 37°C por até 3h e a seguir o material foi homogeneizado e uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula para observação em microscopia de luz.

4.2.2- Microcultivo em ágar fubá

O ágar fubá (Anexo B) adicionado de 1% de Tween 80, previamente fundido, foi colocado sobre lâminas de vidro esterilizadas no interior de placas de Petri. Após solidificação do ágar, as amostras a serem identificadas foram semeadas em estria central única na superfície do meio e cobertas com lamínulas. O material foi incubado em temperatura ambiente por até 7 dias e a seguir levado ao microscópio de luz para observação de clamidoconídios, hifas e leveduras.

4.2.3 Fermentação de carboidratos

Para verificação da fermentação de carboidratos pelas espécies de *Candida*, utilizou-se o meio de cultura caldo vermelho de fenol adicionado de 1% dos seguintes açúcares: glicose, maltose, sacarose e lactose. O meio de cultura com o respectivo açúcar foi distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Duhran invertidos em seu interior. Os tubos foram semeados com culturas puras de 24h das amostras a serem identificadas e incubados a 37°C por até 7 dias. Após este período verificou-se a fermentação dos açúcares através da produção de ácido e formação de gás. A produção de ácido foi observada pela queda do pH do meio de cultura que faz com que sua cor inicialmente vermelha torne-se amarela. A produção de gás foi verificada pela presença de bolhas de ar aprisionadas no interior do tubo de Duhran.

4.2.4- Assimilação de carboidratos

Para esta prova, um meio quimicamente definido (Anexo C) foi fundido e ao atingir a temperatura de 45°C, foi vertido sobre 0.1 mL de suspensão de *Candida* preparada a partir de crescimento de 24h da levedura e com concentração correspondente ao tubo 10 da escala de McFarland. Após homogeneização em movimentos em forma de 8 (oito), o meio foi deixado para solidificação. A seguir, discos de papel de filtros embebidos em soluções a 20% de glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose e rafinose, foram colocados sobre a superfície do ágar. Após incubação a 37°C/48h, observou-se assimilação do açúcar através do crescimento da levedura ao redor do disco de papel de filtro.

4.2.5 - Interpretação dos testes para identificação das espécies de *Candida*

As amostras de *Candida* foram identificadas através da interpretação dos testes fornecida em Samaranayake e MacFarlane (1990) e Sandvén (1990) com modificações e estão apresentadas no quadro abaixo.

QUADRO 1- Identificação de espécies de *Candida* através de formação de tubo germinativo (TG), clamidoconídio (CL), hifas (HIF), provas de fermentação e assimilação de carboidratos.

Espécies de <i>Cândida</i>	TG	CL	HIF	Fermentação					Assimilação					
				GL	S	M	L	GA	GL	S	M	L	GA	R
<i>C. albicans</i>	+	+	+	A/G	A/-	A/G	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-
<i>C. Stellatoidea</i>	V	V	+	A/G	A/-	A/G	-/-	A/G	+	-	+	-	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	A/G	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	+	A/G	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+	A/G	-/-	-/-	-/-	V	+	+	+	-	+	-
<i>C. tropicalis</i>	-	V	+	A/G	A/G	A/G	-/-	V	+	+	+	-	+	-
<i>C. kefyr</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	A/G	A/G	+	+	-	+	+	-

GL: glicose, S: sacarose, M: maltose, L: lactose, Ga: galactose, R: rafinose

A: ácido; G: gás

(+): prova positiva; (-): prova negativa, (v): prova variável

4.3- Manipulação dos Fitoterápicos

Para realização deste estudo foram manipulados extratos alcoólicos de cajueiro (*Anacardium occidentale*), bardana (*Arctium lappa*), tanchagem (*Plantago major*) a 60°GL e tintura de própolis a 30% (Farmácia de Manipulação Ervafarma, Ponta Grossa, PR), (Fig. 1). Os certificados de análise dos produtos utilizados foram fornecidos pela Ervafarma manipulação, farmacêutica responsável Dr^a. Vera Lúcia Daniel Pupo (Anexo D). Na tabela 1 está demonstrada a concentração dos extratos e qual parte da planta utilizada para preparação dos mesmos.

TABELA 1- Descrição das características dos fitoterápicos testados frente à amostras de *Candida* isoladas da cavidade bucal.

Planta	Parte da planta	Solvente	Concentração
Cajueiro	Casca	Álcool de cereais	60%
Bardana	Raiz	Álcool de cereais	60%
Tanchagem	Folha e flor	Álcool de cereais	60%
Própolis	-	Álcool de cereais	30%



Figura 5 - Extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis de uso comercial, utilizados no experimento.

4.4- Sensibilidade dos Isolados de *Candida* aos Fitoterápicos

4.4.1 Testes realizados para determinação da sensibilidade de *Candida* aos fitoterápicos

A verificação da sensibilidade das amostras de *Candida* aos fitoterápicos foi verificada através de testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* foram: a) teste de difusão em ágar, com discos de papel de filtro embebido no fitoterápicos e com poços confeccionados nos meios de cultura; b) teste em tubo, com diluições seriadas da levedura. Os testes *in vivo* foram: c) recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal de ratos tratados com fitoterápicos e d) desenvolvimento de candidose na língua de ratos tratados com fitoterápicos. Os testes foram realizados como descrito abaixo.

Testes *in vitro*

a) Teste de difusão em ágar (disco e poço)

A ação antifúngica dos extratos alcoólicos de cajueiro, bardana, tanchagem e da tintura de própolis foi determinada através do teste de difusão em ágar. As amostras de *Candida*, já identificadas foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C/ 24h. Do crescimento foi preparada uma suspensão comparativa com o tubo 0.5 da escala de McFarland e ajustada em espectrofotômetro, contando aproximadamente 10^6 ufc/mL. Após homogeneização, alíquotas de 0.1 mL da suspensão foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram levadas à estufa por 10 min

para secagem. A seguir, discos de papel de filtro foram embebidos com 10 μ L dos fitoterápicos e depositados na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37°C/48h. Após realizou-se a medição dos halos de inibição do crescimento fúngico. Considerou-se o produto ativo contra as espécies fúngicas em estudo, aquele que produziu halos acima de 10mm de diâmetro (QUEIROZ, 1998).

Em outras placas semeadas com as leveduras, poços de 0.5mm de diâmetro por 0.4mm de profundidade foram confeccionados no ágar Sabouraud. A seguir os poços foram preenchidos com os fitoterápicos e o processo seguiu-se semelhante ao anterior.

b) Teste em tubo

A partir de suspensão de *Candida* comparativa com o tubo 0.5 da escala de McFarland e ajustada em espectrofotômetro, contando aproximadamente 10⁶ ufc/mL, foram feitas diluições decimais até 10⁻⁵. Da amostra mãe e de cada diluição, foi transferido 1 mL para tubo de ensaio contendo 0.1 mL dos extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 10 min. A seguir 0.1 mL de cada tubo foi semeado em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37°C/48h e a seguir foi determinado o número de ufc/mL de *Candida* viável em cada diluição.

Testes *in vivo*

c) Recuperação de *Candida* da cavidade bucal de ratos

Vinte e cinco ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, pesando cerca de 250g, provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, foram divididos em cinco grupos de quatro animais. Com o auxílio de uma seringa de 1 mL, os animais receberam 3 inoculações de 0.2 mL de suspensão contendo 10^8 células de *C. albicans*/mL na cavidade bucal, com intervalos de 1h entre elas. A amostra de *C. albicans* utilizada foi isolada de um paciente deste estudo. Uma hora após a última inoculação, os animais receberam os extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis na água de beber, na concentração de 1,5% durante 24h. Cinco ratos receberam água “*ad libitum*” e foram usados como controle. Vinte e quatro horas após a inoculação, foi realizada a recuperação da levedura da cavidade bucal dos ratos com o auxílio de um “swab” esterilizado que foi passado na pelas estruturas bucais durante 1 minuto. O “swab” foi colocado em um tubo de ensaio contendo 1.0 mL de solução fisiológica. A partir dessa amostra, foram feitas diluições decimais até 10^{-3} e alíquotas de 0.1mL da suspensão inicial e das diluições foram semeadas em duplicata em ágar Sabouraud Dextrose adicionado de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C/48h e a seguir realizou-se a contagem do número de ufc/mL de levedura recuperado da boca dos animais (Fig. 6). O mesmo procedimento foi realizado fazendo-se uma única inoculação da levedura, com sacrifício dos animais também após 24h.

d) Candidose na língua de ratos

Após realização da coleta de material para recuperação de *Candida*, os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter etílico e a língua foi retirada e fixada em formol a 10% para análise histológica. A língua foi seccionada sagitalmente e transversalmente na região do tubérculo intermolar, processada e incluída em parafina. Os cortes obtidos, de 5 μ m, foram corados pelas técnicas de HE e PAS-H. A presença de candidose foi verificada por toda a extensão do epitélio da língua, compreendendo as papilas cônicas simples da região anterior e as papilas gigantes e verdadeiras da parte posterior da língua.



A



B



C



D



Figura 6 - A- Inoculação de *C. albicans* na cavidade bucal dos ratos; B - Transferência do “swab” para tubo de ensaio contendo solução fisiológica, após recuperação da levedura; C- Diluição da amostra; D – Semeadura em ágar sabouraud Dextrose; E – contagem do número de ufc/mL de *C. albicans* recuperado da cavidade bucal dos animais.

4.5- Sensibilidade de *Candida* a antifúngicos comerciais (Antifungigrama)

4.5.1- Testes realizados

A sensibilidade das amostras de *Candida* aos antifúngicos comerciais foi determinada através de dois testes: a) teste de difusão em ágar, com discos embebidos no antifúngico (CECON Ltda) e b) teste ATB Fungus (bioMeriéux), seguindo-se a metodologia determinada pelo fabricante, e descrita a seguir.

a) Teste de difusão em Agar

Das amostras de *Candida* isoladas e identificadas, foi selecionada uma amostra de cada espécie para realização do antifungigrama. As espécies de *Candida* foram semeadas em ágar sabouraud dextrose e incubadas a 37°C/24h. Do crescimento foi preparada uma suspensão comparativa com o tubo 0.5 da escala de

McFarland e ajustada em espectrofotômetro, contando aproximadamente 10^6 ufc/mL. Após homogeneização, alíquotas de 0.1 mL da suspensão foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose. As placas foram levadas à estufa por 10 min para secagem. A seguir, discos de papel de filtro embebidos nos antifúngicos (Nistatina 100 UI, Ketoconazol 50 mcg, Anfotericina B 100 mcg, Fluconazol 25 mcg, Clotrimazol 50mcg, Miconazol 50 mcg, 5 Fluorocitosina 1 mcg, 5 Fluorocitosina 10 mcg, CECON – Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda.), foram depositados sobre a superfície do meio de cultura. Após incubação a 37°C/48h, foi realizada a medição dos halos de inibição do crescimento e feita comparação com tabela enviada pelo fabricante (Anexo E) (Fig 6).

b)- ATB fungus

As galerias ATB FUNGUS (bioMeriëux – Anexo F) permitem determinar a sensibilidade das leveduras em meio semi-sólido. As galerias contêm 16 pares de cúpulas; 04 pares não contêm antifúngico e servem de controle de cultura. Os outros pares contêm diferentes antifúngicos em duas concentrações para classificar as estirpes. Dois antifúngicos estão presentes em várias concentrações, o que permite completar a resposta mediante uma CMI. A levedura a analisar é posta em suspensão e depois transferida para o meio de cultura e inoculada na galeria. Após 24-48 horas de incubação, a leitura do crescimento fez-se com o sistema ATB. O resultado permite classificar a estirpe como Sensível, Intermediária ou Resistente (Fig. 4).

4. 5.2- Preparação do inóculo

Preparou-se uma suspensão de leveduras com opacidade equivalente ao padrão dois de McFarland na ampola presente no Kit; utilizou-se para verificação o densitômetro fornecido pela bioMérieux. Transferiram-se 100µl desta suspensão para uma ampola de ATB F Medium utilizando-se uma pipeta automática (Fig. 9).

4.5.3 - Inoculação da galeria

Foi utilizado o método automático, no qual colocou-se no suporte do inoculador ATB uma galeria, uma ponta ATB e duas ampolas de ATB F Medium, inoculadas como acima mencionado. A ampola da direita recebeu 50µl de ATB F Buffer (substância tampão). O inoculador realiza automaticamente a homogeneização do ATB F Medium e o preenchimento das cúpulas (Figura 5). Colocou-se uma tampa na galeria e incubou-se por 48 horas a 30° C em aerobiose.

4.5.4- Leitura da galeria e interpretação

Foi usado o método automático, com o software fornecido pela bioMérieux. Colocou-se a galeria no suporte do aparelho ATB e deu-se a ordem de leitura ao computador (Figura 10). Os antifúngicos usados no teste foram Flucitosina, Anfotericina B, Nistatina, Miconazol, Econazol e Ketoconazol.



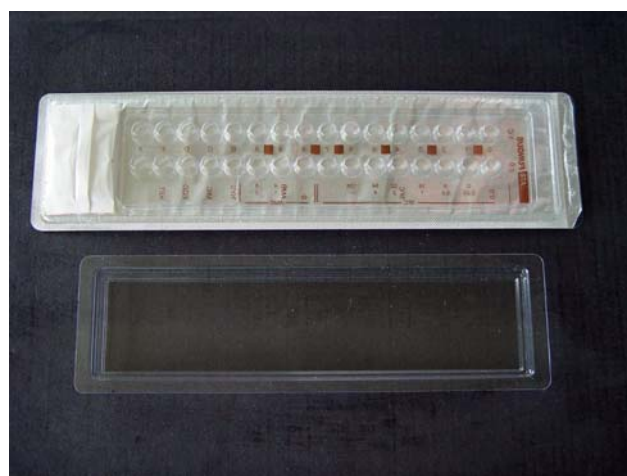
Figura 7 - Antifúngicos comerciais utilizados no experimento do teste de difusão em ágar



A



B



C

Figura 8 - Sistema ATB FUNGUS – A: ATB- MÉDIUM: meio de preparo da suspensão de *Candida*, B: ATB- BUFFER: solução tampão, C: Galeria de antifúngicos em diferentes concentrações.



Figura 9 - Sistema ATB FUNGUS: Pipetador automático e densitômetro para padronização da suspensão de *Candida*.



Figura 10 - Sistema ATB FUNGUS: Leitora da galeria de antifúngicos e software (bioMérieux) para o teste.

5- RESULTADOS

5.1- Coleta de Saliva e Isolamento de *Candida*.

A pesquisa de *Candida* na cavidade bucal foi realizada em 86 pacientes, sendo 40 do sexo masculino e 46 do sexo feminino, com idade entre 18 e 82 anos. Destes 86 pacientes, 38 (44.18%) foram positivos para *Candida*, sendo 20 (23.25%) homens e 18 (20.93%) mulheres. Nenhum dos pacientes apresentava candidose clínica.

5.2- Identificação das Espécies de *Candida*

Das 38 amostras isoladas, 18 foram caracterizadas como *C. albicans*, 13 como *C. tropicalis*, 3 como *C. parapsilosis*, 2 como *C. guilliermondii*, 1 *C. krusei* e 1 *C. kefyr*.

5.3- Sensibilidade dos Isolados de *Candida* aos Fitoterápicos e Própolis

Foram realizados quatro tipos de testes, dois *in vitro* e dois *in vivo*: Os testes *in vitro* são: a) teste de difusão em agar, b) teste em tubo de ensaio. Os testes *in vivo* são: c) recuperação de *Candida* da boca de ratos e d) candidose na língua de ratos.

a) Teste de difusão em agar

Quando se comparou os resultados obtidos nos métodos de discos de papel e poços confeccionados no ágar, os resultados foram semelhantes. Assim, apenas os resultados em disco de papel serão apresentados.

As amostras foram consideradas sensíveis aos extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis, quando os halos de inibição de crescimento foram superiores a 10mm, segundo proposto por Queiroz (1998).

5.3.1- Cajueiro

O número e porcentagem de amostras de *Candida* sensíveis ao extrato de cajueiro está demonstrado na tabela 2.

Das 18 amostras de *C. albicans* testadas, em sete não houve inibição do crescimento (0 mm); e em 4 amostras o diâmetro variou entre 6 e 7 mm. Sete isolados apresentaram halos com diâmetros maiores que 10mm, que variaram entre 11 e 15mm. Para *C. tropicalis*, sensibilidade ao extrato de cajueiro foi observada em 4 das 13 espécies, com halos entre 10 e 13mm. As amostras de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* não foram inibidas pelo extrato (Gráfico 1).

Tabela 2- Número de amostras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfy* que apresentaram sensibilidade ao extrato de cajueiro.

Espécies de <i>Candida</i>	Número de amostras sensíveis	% de amostras sensíveis
<i>C. albicans</i> (n=18)	7	38.9%
<i>C. tropicallis</i> (n=13)	4	30.8%
<i>C. parapsilosis</i> (n=3)	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	0	0
<i>C. krusei</i> (n=1)	0	0
<i>C. kerfyr</i> (n=1)	0	0

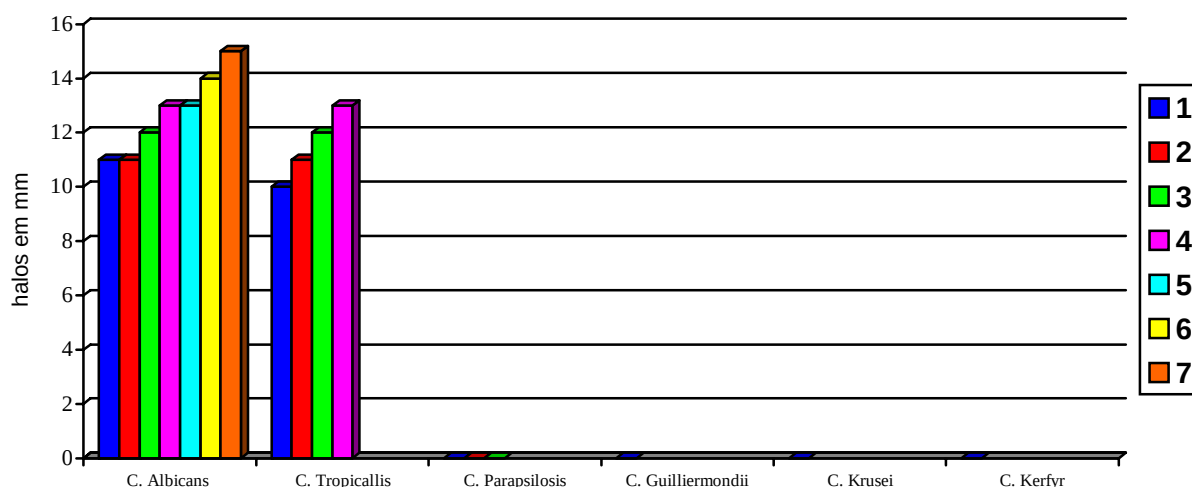


Gráfico 1 - Halos de inibição de crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* frente ao extrato de cajueiro

5.3.2- Bardana

O número de amostras de *Candida* sensíveis ao extrato de bardana está demonstrado na tabela 3.

Das 18 amostras de *C. albicans* testadas, em 11 não houve inibição do crescimento (0 mm); e em cinco amostras o diâmetro variou entre 6 e 9 mm. Apenas 2 das amostras isoladas apresentaram halos de inibição com diâmetros maiores que 10mm, sendo uma com 11mm e a outra com 12mm. Para *C. tropicalis*, sensibilidade ao extrato de bardana foi observada em 1 amostra, com inibição de crescimento de 14mm; 11 foram negativas e apenas 1 apresentou halo de 9mm. As amostras de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* não foram inibidas pelo extrato (Gráfico 2).

Tabela 3 - Número de amostras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* que apresentaram sensibilidade ao extrato de bardana.

Espécies de <i>Candida</i>	Número de amostras sensíveis	% de amostras sensíveis
<i>C. albicans</i> (n=18)	2	11.1%
<i>C. tropicalis</i> (n=13)	1	7.6%
<i>C. parapsilosis</i> (n=3)	2	66.6%
<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	0	0
<i>C. krusei</i> (n=1)	0	0
<i>C. kerfyr</i> (n=1)	0	0

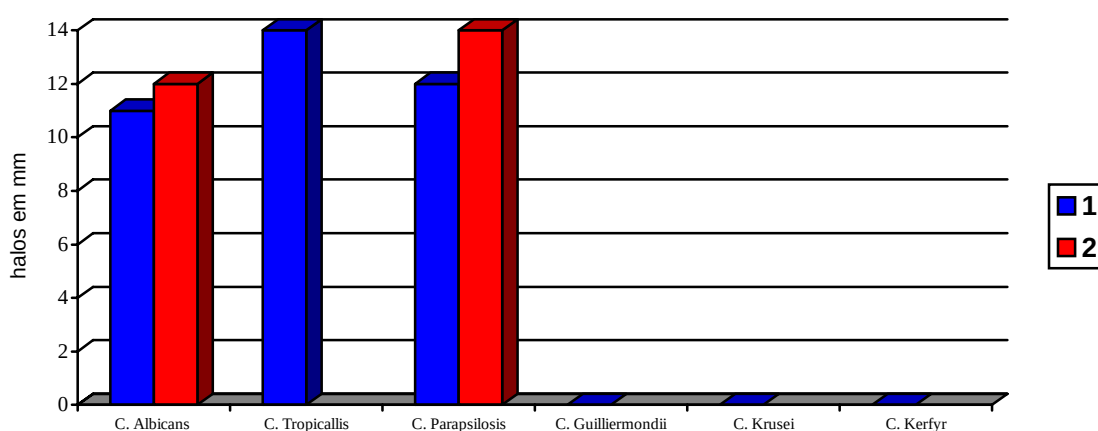


Gráfico 2 - Halos de inibição de crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* frente ao extrato de bardana.

5.3.3- Tanchagem

O número de amostras de *Candida* sensíveis ao extrato de tanchagem está demonstrado na tabela 4. Das 18 amostras de *C. albicans* testadas, em 11 não houve inibição do crescimento (0 mm); e em cinco amostras o diâmetro variou entre 6 e 9 mm. Apenas 2 das amostras isoladas apresentaram halos de inibição com diâmetros de 10mm. Para *C. tropicalis*, sensibilidade ao extrato de tanchagem foi observada em 1 amostra, com inibição de crescimento de 12mm e as

demais foram negativas. A amostra de *C. guilliermondii* apresentou halo de inibição de 9mm. As amostras de *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. kerfyr* não foram inibidas pelo extrato (Gráfico 3).

Tabela 4 - Número de amostras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* que apresentaram sensibilidade ao extrato de tanchagem.

Espécies de <i>Candida</i>	Número de amostras sensíveis	% de amostras sensíveis
<i>C. albicans</i> (n=18)	2	11.1%
<i>C. tropicalis</i> (n=13)	1	7.6%
<i>C. parapsilosis</i> (n=3)	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	0	0
<i>C. krusei</i> (n=1)	0	0
<i>C. kerfyr</i> (n=1)	0	0

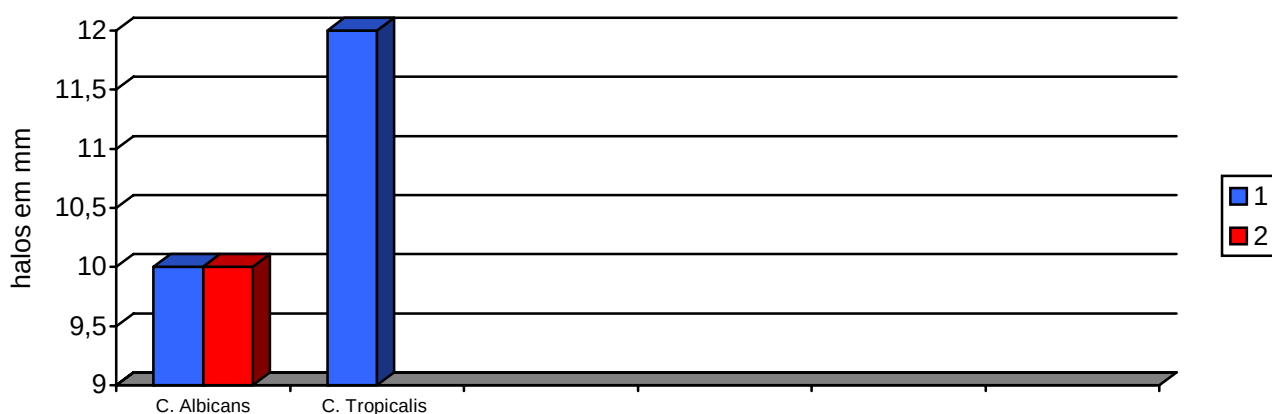


Gráfico 3 - Halos de inibição de crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* frente ao extrato de tanchagem

5.3.4- Própolis

Dentre os extratos testados, a própolis foi a mais eficaz, inibindo o crescimento de 72.2% das amostras de *C. albicans*, 84.6% das amostras de *C. tropicalis*, 66.6% das amostras de *C. parapsilosis*. *C. krusei* não foi sensível ao extrato de própolis (Tabela 5).

Das 18 amostras de *C. albicans* testadas, em três não houve inibição do crescimento (0 mm); e em duas amostras o diâmetro foi de 9mm. Nas 13 restantes, o diâmetro dos halos de inibição variou entre 10 e 23 mm. Para *C. tropicalis*, sensibilidade ao extrato de própolis foi observada em 11 das 13 amostras estudadas, sendo que nas duas outras os halos apresentavam 7 e 8 mm. Uma amostra de *C. parapsilosis* e a amostra de *C. krusei* apresentaram halos medindo respectivamente 6 e 8 mm. As duas amostras de *C. parapsilosis* apresentaram halos de inibição entre 12 e 14 mm e as de *C. guilliermondii* e *C. kerfyr*, apresentaram respectivamente 13 e 19 mm de diâmetro do halo de inibição (Gráfico 4).

Tabela 5 - Número de amostras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* que apresentaram sensibilidade ao extrato de própolis.

Espécies de <i>Candida</i>	Número de amostras sensíveis	% de amostras sensíveis
<i>C. albicans</i> (n=18)	13	72.2%
<i>C. tropicalis</i> (n=13)	11	84.6%
<i>C. parapsilosis</i> (n=3)	2	66.6%
<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	1	100%
<i>C. krusei</i> (n=1)	0	0%
<i>C. kerfyr</i> (n=1)	1	100%

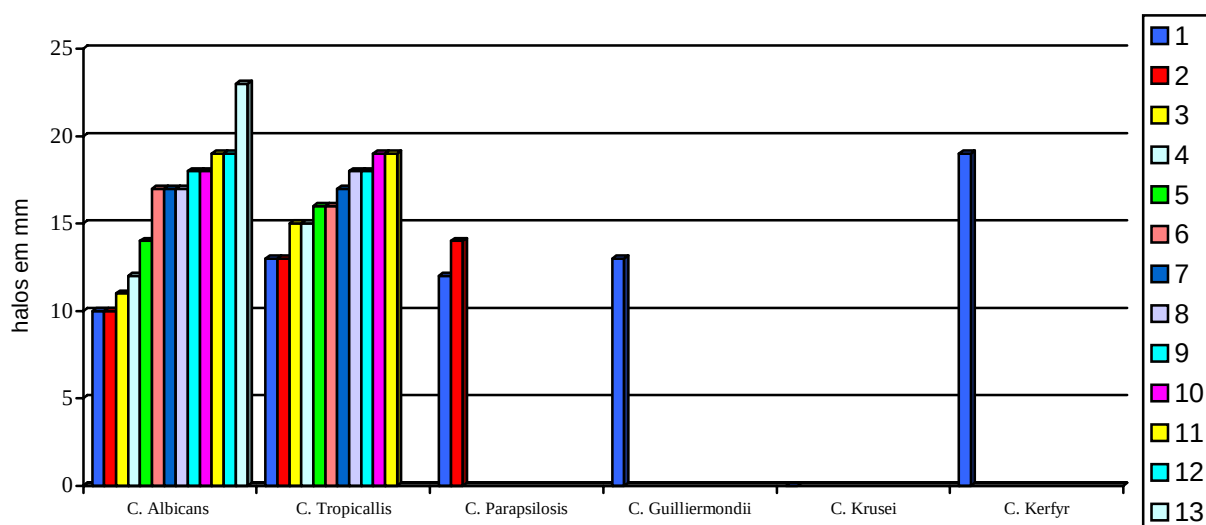


Gráfico 4 - Halos de inibição de crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* frente ao extrato de própolis

Própolis apresentou maior atividade inibitória frente a todas as espécies, exceto *C. kruzei*, que não foi sensível a nenhum deles. Cajueiro foi eficaz para inibir grande número de amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Bardana e tanchagem mostraram efeito apenas sobre um número pequeno de amostras. *C. kruzei* não foi inibida por nenhum dos produtos testados (Tabela 6).

Tabela 6 - Número e porcentagem de amostras sensíveis aos extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis e média do diâmetro (em mm) dos halos de inibição do crescimento das espécies de *Candida* testadas.

Extratos	Cajueiro		Bardana		Tanchagem		Própolis	
	amostras	halo	amostras	halo	amostras	halo	amostras	halo
<i>C. albicans</i>	7 (38.9%)	12	2 (11.1%)	11,5	2 (11.1%)	10	13 (72.2%)	15,8
<i>C. tropicalis</i>	4 (30.8%)	11.5	1 (7.6%)	14	1 (7.6%)	12	11 (84.6%)	16.2
<i>C. parapsilosis</i>	0		2 (66.6%)	13	0		2 (66.6%)	13
<i>C. guilliermondii</i>	0		0		0		1 (100%)	13
<i>C. kruzei</i>	0		0		0		0	
<i>C. kefyr</i>	0		0		0		1 (100%)	19

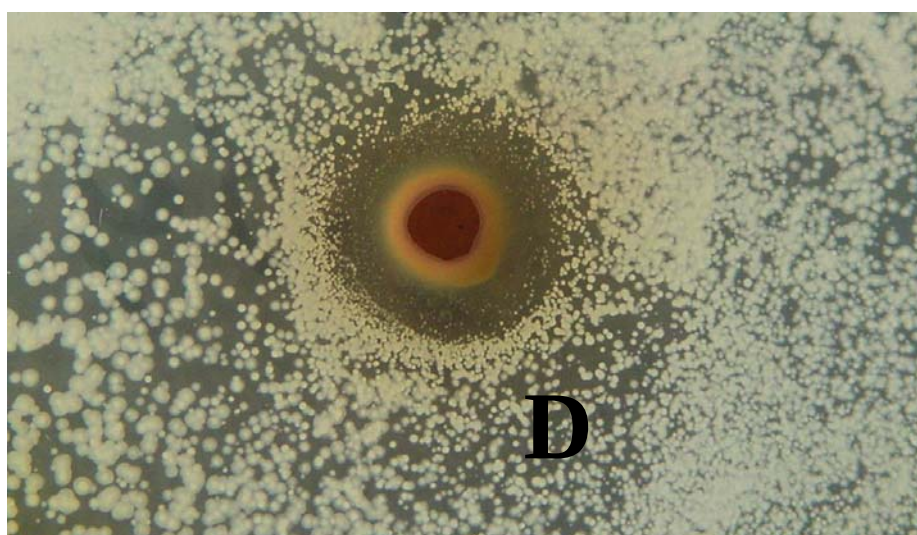


Figura 11 – Halo de inibição de crescimento produzido pela própolis frente a amostra de *C. albicans*.

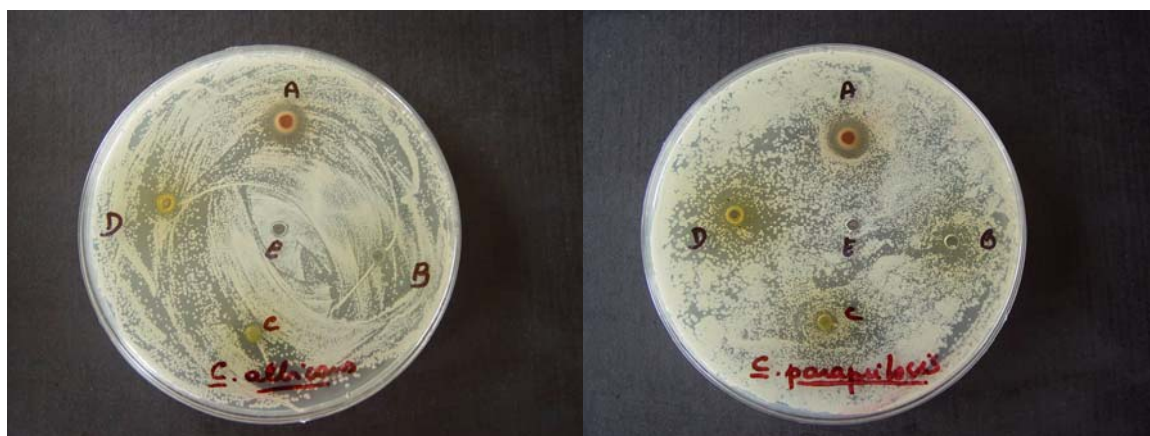


Figura12- Halos de inibição produzidos pelos extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis frente à amostra de *C. albicans* (A) e *C. parapsilosis* (B).

I

b) Teste em tubo

Quando a suspensão das espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr*, padronizada através do tubo 0.5 da escala de McFarlane e espectrofotômetro foi semeada em ágar Sabouraud Dextrose, determinou-se a presença de 3.6 a 4.0×10^6 células/mL. Após 10 min em contato com os extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis, houve redução acentuada no número de leveduras viáveis (Tabela 7).

O crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi completamente inibido pelos extratos de tanchagem e própolis. Ocorreu redução de 10^6 para 10^4 células/mL com o extrato de cajueiro e de 10^6 para 10 com o extrato de bardana.

Após 10 min, não houve crescimento de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kerfyr* submetidas à ação da bardana, tanchagem e própolis (Tabela 7).

Tabela 7- Efeito bactericida de extratos de cajueiro, bardana, tanchagem e própolis frente a amostras de *Candida*.

Espécies	Controle	Cajueiro	Bardana	Tanchagem	Própolis
<i>C. albicans</i>	3.6×10^6	2.0×10^4	3.0×10	0	0
<i>C. tropicalis</i>	4.0×10^6	18.2×10^4	2.0×10	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	4.0×10^6	2.0×10^3	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	3.6×10^6	0	0	0	0
<i>C. kruzei</i>	3.6×10^6	0	0	0	0
<i>C. kefyr</i>	3.6×10^6	0	0	0	0

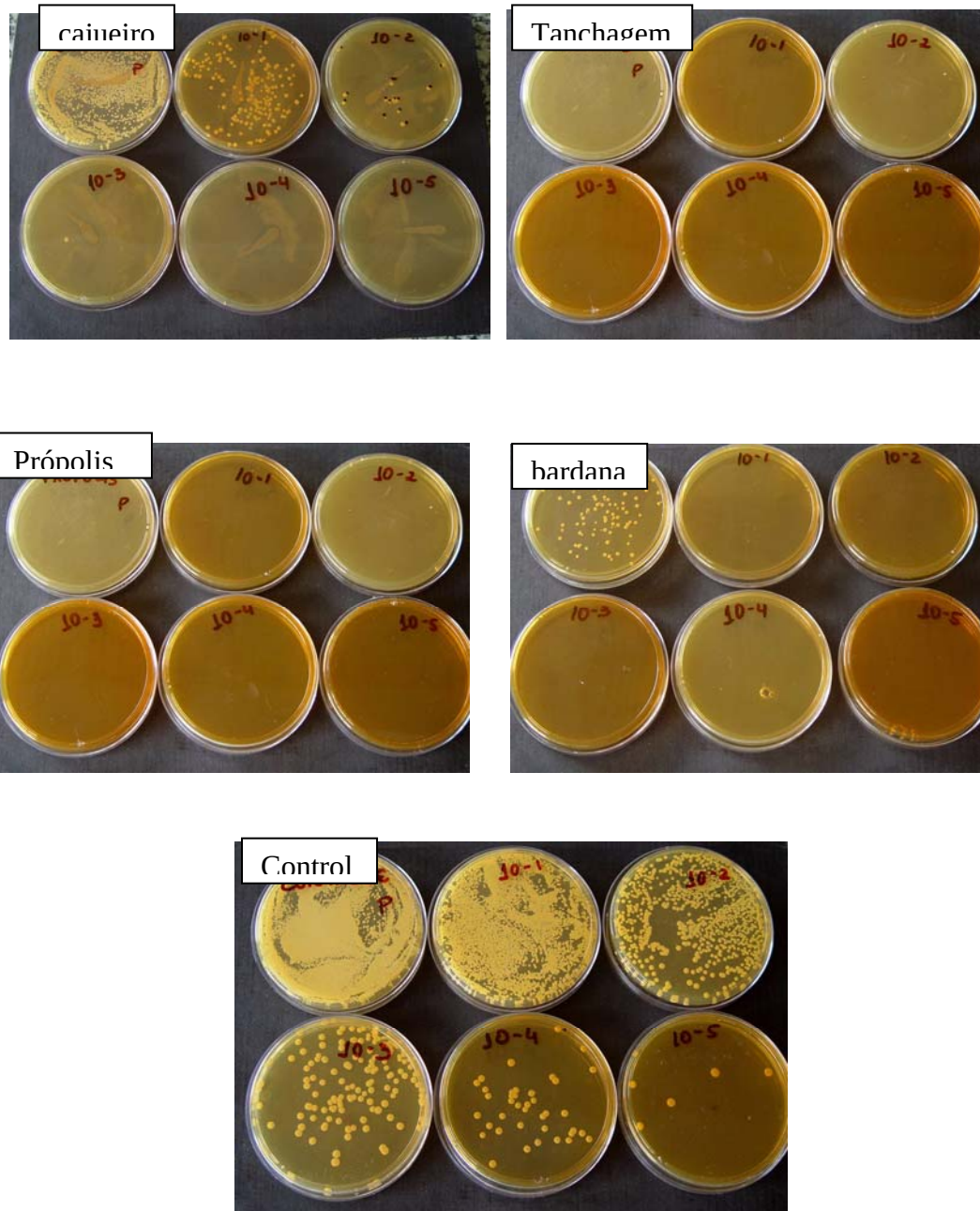


Figura13- Efeito bactericida sobre *C. albicans* após 10 minutos em contato com os extratos de cajueiro (A) bardana (B), tanchagem (C) e própolis (D), quando comparados com o controle (E).

c) Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos ratos

C. albicans foi recuperada da cavidade bucal dos animais 24h após inoculação da levedura. Os produtos mais eficazes na redução de *C. albicans* na cavidade bucal dos ratos foram, em ordem decrescente: própolis, tanchagem, bardana. O extrato de cajueiro não foi eficaz, sendo o número de leveduras recuperado superior ao controle (Tabela 8).

Tabela 8- Média e desvio padrão do número de ufc/mL de *C. albicans* recuperado da cavidade bucal dos ratos 24h após 3 inoculações da levedura.

Extratos	ufc/mL de <i>C. albicans</i>
Cajueiro	$14.3 \times 10^2 \pm 13.3 \times 10^2$
Bardana	$11.2 \times 10^2 \pm 13.5 \times 10^2$
Tanchagem	$4.1 \times 10^2 \pm 1.5 \times 10^2$
Própolis	$0.8 \times 10^2 \pm 0.4 \times 10^2$
Controle	$12.6 \times 10^2 \pm 6.8 \times 10^2$

Tabela 9 - Média e desvio padrão do número de ufc/mL de *C. albicans* recuperado da cavidade bucal dos ratos 24h após inoculação única da levedura.

Extratos	ufc/mL de <i>C. albicans</i>
Cajueiro	$1.25 \times 10^3 \pm 1.19 \times 10^3$
Bardana	$0.60 \times 10^3 \pm 0.27 \times 10^3$
Tanchagem	$0.27 \times 10^3 \pm 0.16 \times 10^3$
Própolis	$0.31 \times 10^3 \pm 0.22 \times 10^3$
Controle	$1.02 \times 10^3 \pm 1.32 \times 10^3$

c) Candidose na língua de ratos

Candidose foi verificada no epitélio da superfície dorsal da língua, abrangendo as papilas cônicas simples, gigantes e verdadeiras. Candidose caracterizou-se pela presença de hifas no interior da camada de queratina do

epitélio. Após 3 inoculações consecutivas, com intervalos de 1h entre elas, não foram observadas áreas de candidose nos grupos tratados com os fitoterápicos. Nos animais controle, o número de áreas com candidose foi extremamente baixo, tendo sido observadas 3 áreas em 3 animais. Presença de microabscesso intraepitelial também foi observada em uma dessas áreas. Em um rato tratado com tanchagem, observou-se a presença de microabscesso intraepitelial, sem a presença de hifas. Todas as áreas de candidose foram encontradas na região das papilas cônicas simples que revestem a porção anterior da língua.

Podemos deduzir que a não fixação da *C. albicans* na língua dos ratos pode ser devido a baixa patogenicidade das cepas ou falta de fatores predisponentes.

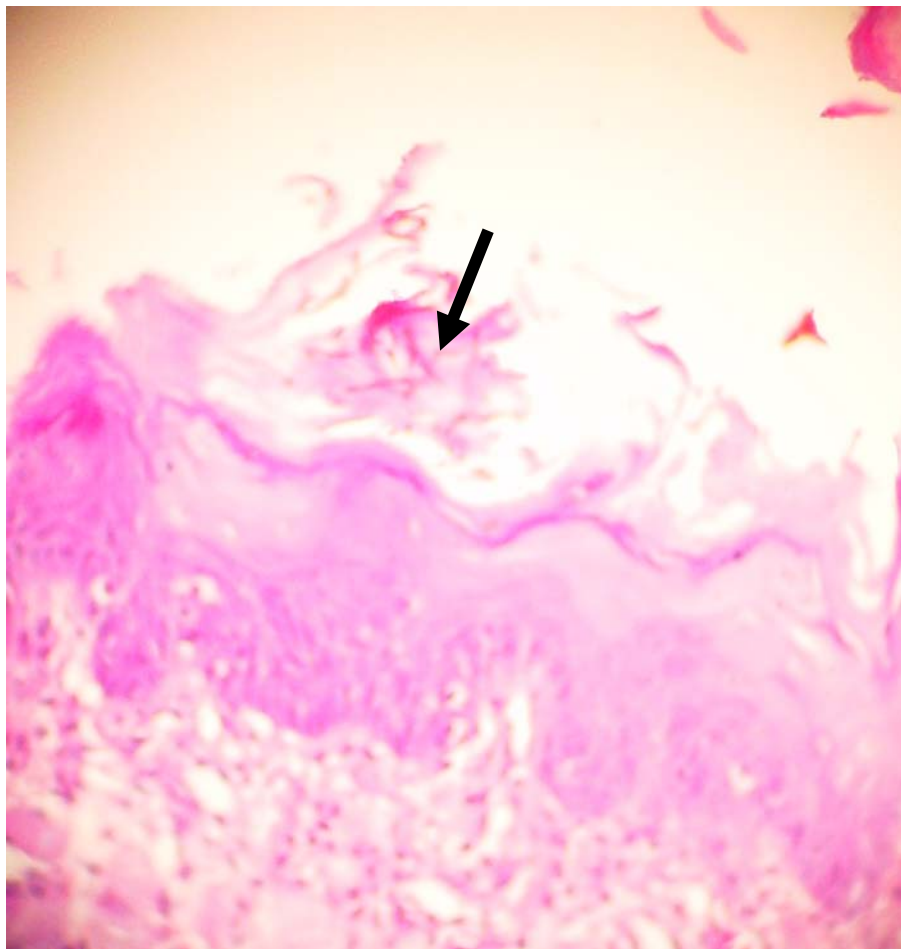


Figura 14 - Área de candidose observada na região das papilas cônicas simples de um animal controle, onde se observa a presença de hifas no interior da camada de queratina.400X.

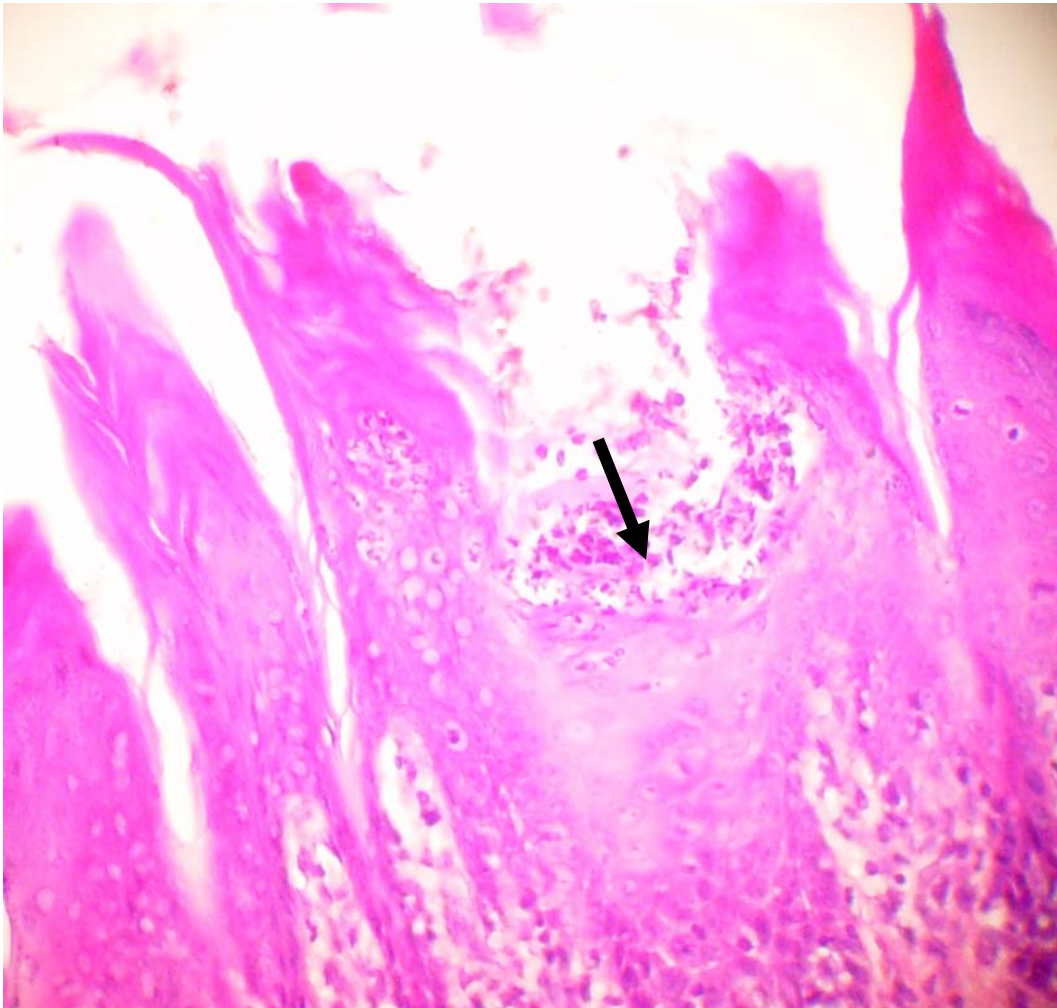


Figura 15- Presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com formação de microabscesso intraepitelial sem a presença de hifas de *C. albicans*, na região das papilas cônicas simples de rato controle. 400X

5.4- Sensibilidade dos Isolados de *Candida* aos Antifúngicos Comerciais

a) Teste de difusão em ágar (antifungigrama)

O antifungigrama foi realizado com uma amostra de cada espécie de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* isolada da cavidade bucal. As amostras foram testadas frente aos seguintes antifúngicos: Fluconazol

25mcg (FLU), 5 Fluorocitosina 10mcg (5FC), 5 Fluorocitosina 1mcg (5FC), Ketoconazol 50mcg (KET), Nistatina 100UI (NY), Miconazol 50mcg (MCZ), Clotrimazol 50mcg (CTR), Econazol 50mcg (EC), Anfotericina B 100mcg (AB) – CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico. A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a especificação técnica do fabricante (Anexo E). As amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis* A testadas apresentaram resistência ao 5FC 1 e 10mcg.

Tabela 10 - Diâmetro dos halos de inibição de crescimento produzido pelos antifúngicos testados frente a amostras de *Candida*.

Antifúngicos	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>
FLU	S	S	S	S
5 FC 10	R	R	S	S
5 FC 1	R	R	S	S
KET	S	S	S	S
NY	S	S	S	S
MCZ	S	S	S	S
CTR	R	S	S	S
EC	S	S	S	S
AB	S	S	S	S



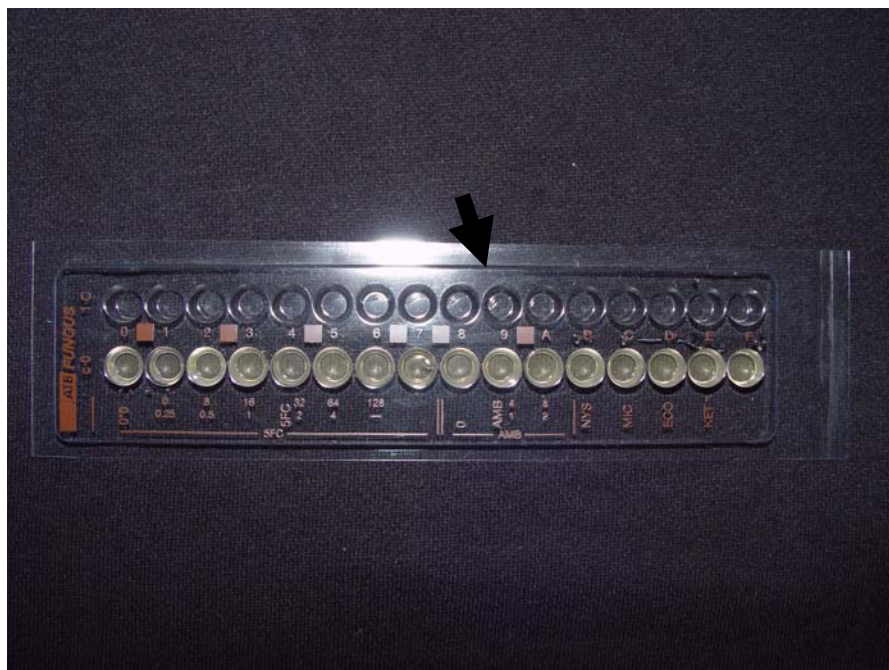
Figura 16- Halos de inibição de crescimento observado em antifungigrama com discos de papel realizado nas amostras de *C. tropicalis* (B) e *C. guilliermondii* (C).

b) ATB-Fungus

A leitura das galerias com os antifúngicos frente a amostras de *Candida* estão demonstradas na tabela 10. Apenas 2 amostras de *C. tropicalis* mostraram-se resistentes miconazol, Econazol e ketoconazol (Fig. 5).

Tabela 11- Sensibilidade das amostras de *Candida* aos antifúngicos testados no teste ATB-Fungus.

Amostras	Flucitosina	Anfotericina	Nistatina	Miconazol	Ecoconazol	Ketoconazol
<i>C. albicans A</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. albicans B</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis A</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis B</i>	S	S	S	S	R	R
<i>c. Tropicalis C</i>	S	S	S	R	R	R
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. guilliermondii</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. Kerfyr</i>	S	S	S	S	S	S

Figura 17- Galeria ATB-FUNGUS com amostra de *Candida* semeada para incubação e teste frente aos antifúngicos.

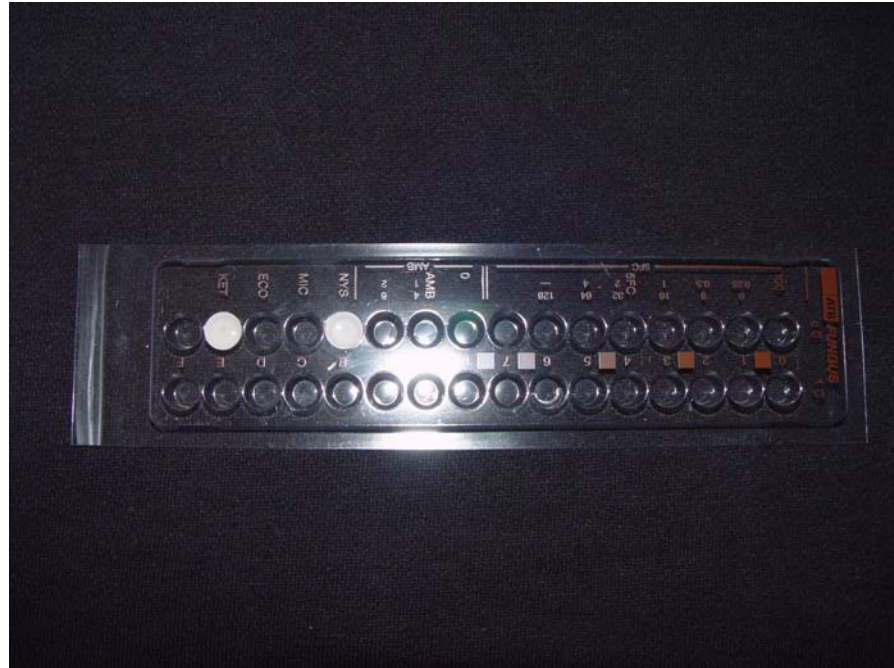


Figura 18- Galeria ATB-FUNGUS após incubação mostrando a resistência de *C. tropicalis* a dois antifúngicos, como mostrado na tabela 10.

5.5- Análise estatística

Para análise dos dados obtidos com os testes *in vivo* foi utilizado o modelo paramétrico de análise de variância de dois critérios (ANOVA – *two way*), considerando as variáveis fixas, o número de inoculações e as substâncias utilizadas, sendo a variável de comparação o número de unidades formadoras de colônias/mL (10^3). A normalidade foi testada através do teste de Shapiro-Wilk, a equivalência das variâncias (homocedasticidade) analisada com o teste de Levene. Caso fossem observadas diferenças significativas entre os grupos, as comparações seriam feitas através do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A análise dos dados referentes à diâmetro dos halos de inibição obtidos com os ensaios *in vitro*, foi realizada com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Caso fossem encontradas diferenças entre os grupos, as comparações entre os grupos seriam realizadas com o teste de Dunn.

O nível de significância estabelecido foi de 5% ($\alpha=0,05$), ou seja, se $p<0,05$, as diferenças entre os grupos seria considerada significativa, não aceitando assim a hipótese de nulidade (H_0). Todos os cálculos foram realizados utilizando os softwares SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) version 11.5.1 for Windows (SPSS Inc. Chicago Illinois USA) e GraphPad InStat version 3.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA).

Resultados

O resultado do teste de normalidade para o ensaio *in vivo*, mostrou que a maioria dos grupos apresentava uma aproximação de uma distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk (Tabela 12). A análise da equivalência das variâncias (teste de Levene) não foi significativa considerando os grupos independentes do número de inoculações ($p=0,058$), conforme a Tabela 13.

Tabela 12- Teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para a recuperação de ufc/10³mL nos grupos

Substância	Estatística	Graus de Liberdade	Significância
Cajueiro	0,888	10	0,162
Bardana	0,855	10	0,066
Tanchagem	0,850	10	0,058
Própolis	0,750	10	0,004*
Controle	0,903	10	0,238

*p<0,05 – considerado significativo

Tabela 13- Teste de equivalência das variâncias (Levene) para a recuperação de ufc/10³mL nos grupos.

Fisher	Graus de Liberdade 1	Graus de Liberdade 2	Significância
2,055	9	40	0,058

*p<0,05 – considerado significativo

Os resultados da comparação contagem de UFC10³/mL utilizando o teste ANOVA com dois critérios, mostraram diferenças significativas considerando os fatores inoculação (p<0,001), substâncias (p=0,001), não ocorrendo diferenças significativas entre a interação inoculação e substâncias (p=0,059). Os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Análise de variância – dois critérios. ufc10³/mL

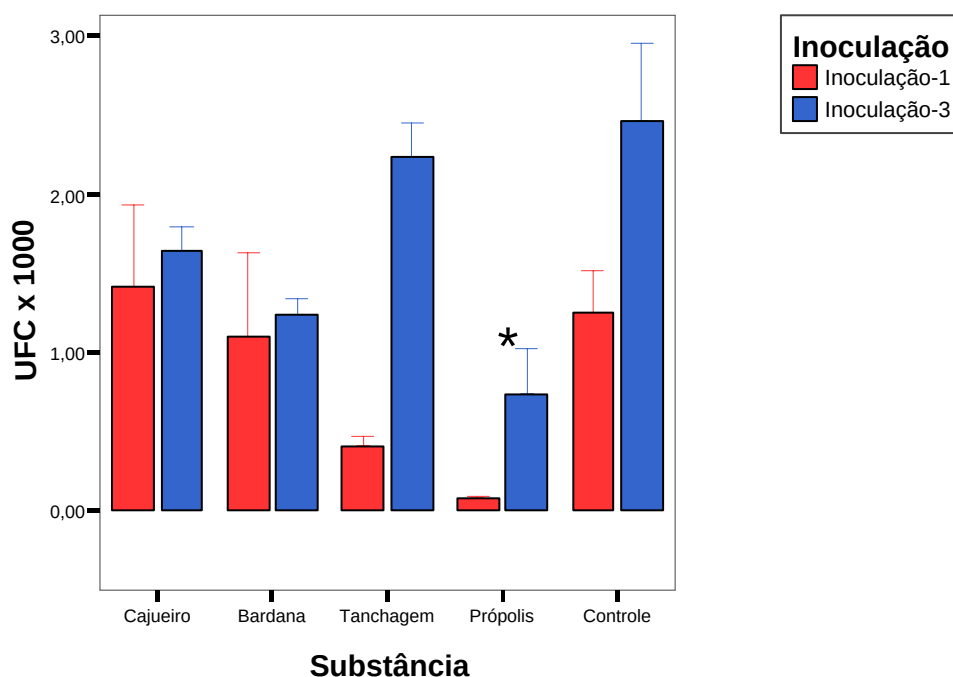
Causas de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias dos quadrados	F	Significância.
Inoculação	8,225	1	8,225	16,289	P<0,001*
Substâncias	11,748	4	2,937	5,817	P=0,001*
Inoculação x substâncias	5,008	4	1,252	2,480	P=0,059
Tratamentos	24,981	9	2,776	5,947	P<0,001*
Resíduo	20,197	40	0,505	---	---
Total	45,178	59	---	---	---

*p<0,05 – considerado significativo

Como foram observadas diferenças estatísticas para o fator substâncias, realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey, para identificar onde situavam-se as diferenças (Gráfico 5 e Tabela 15).

Tabela 15- Comparações múltiplas de Tukey – Fator substâncias

(I) Substância	(J) Substância	Diferenças media (I-J)	Significância.	Intervalo de confiança 95%	
				Limite inferior	Limite superior
Cajueiro -	Bardana	0,3628	P=0,784	-0,5448	1,2704
Cajueiro -	Tanchagem	0,2128	P=0,962	-0,6948	1,1204
Cajueiro -	Própolis	1,1269	P=0,008*	0,2193	2,0345
Cajueiro -	Controle	-0,3266	P=0,841	-1,2342	0,5810
Bardana -	Tanchagem	-0,1500	P=0,989	-1,0576	0,7576
Bardana -	Própolis	0,7641	P=0,135	-0,1436	1,6717
Bardana -	Controle	-0,6894	P=0,212	-1,5971	0,2182
Tanchagem -	Própolis	0,9140	P=0,048*	0,0064	1,8217
Tanchagem -	Controle	-0,5394	P=0,447	-1,4471	0,3682
Própolis-	Controle	-1,4535	P<0,001*	-2,3611	-0,5459



* versus Cajueiro, Tanchagem e Controle $p < 0,05$ - Significativo

Gráfico 5- UFC x 10^3 /mL com as diferenças entre substâncias e inoculações (Média e Erro padrão).

Os dados obtidos com os ensaios in vitro com *C. albicans*, mostraram diferenças significativas (Teste de Kruskal-Wallis) considerando as substâncias ($p < 0,001$), os dados são mostrados na Tabela 16. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de comparações múltiplas de Dunn (Tabela 17). Os resultados são apresentados no Gráfico 6.

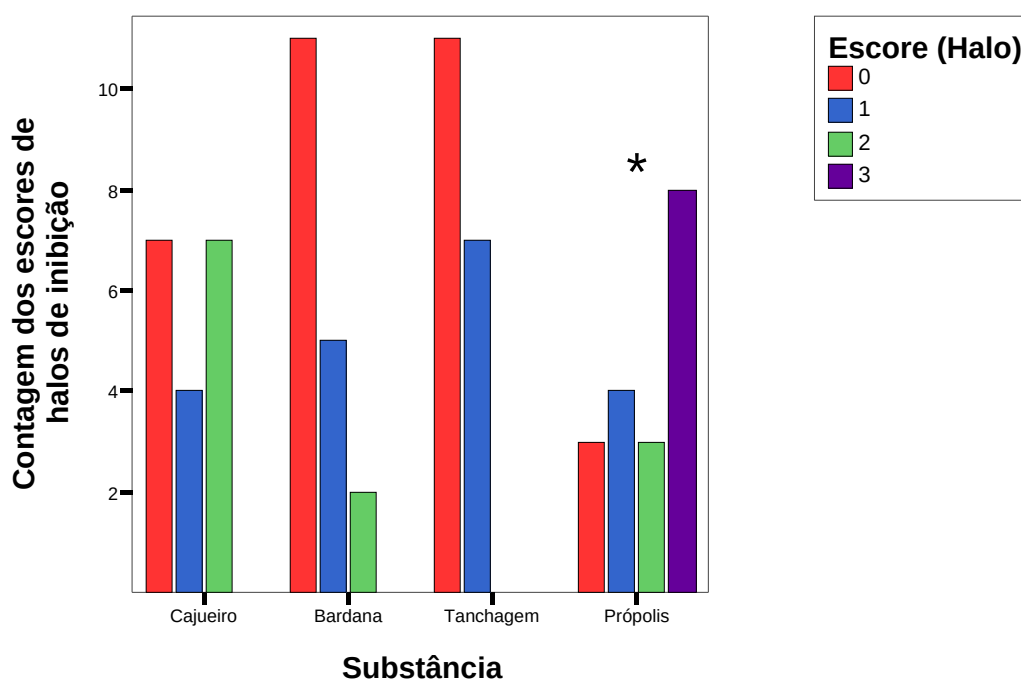
Tabela 16- Postos médios para os escores de halo de inibição para *C. albicans* – a Teste de kruskal-Wallis

Substâncias	N	Soma dos Postos	Postos Médios
Cajueiro	18	695,00	38,61
Bardana	18	511,00	28,39
Tanchagem	18	479,00	26,61
Própolis	18	943,00	52,39

KW=19,527 (corrigido para empates) – $p < 0,001^*$ - Diferenças significativas

Tabela 17- Diferenças entre os grupos – Comparações múltiplas de Dunn.

Comparação	Diferenças entre os postos	Significância
Cajueiro x Bardana	10,222	$P > 0,05$
Cajueiro x Tanchagem	12,000	$P > 0,05$
Cajueiro x Própolis	-13,778	$P > 0,05$
Bardana x Tanchagem	1,778	$P > 0,05$
Bardana x Própolis	-24,000	$P < 0,01^*$
Tanchagem x Própolis	-25,778	$P < 0,001^*$



* versus Bardana e Tanchagem $p < 0,05$ - Significativo

Gráfico 6- Escores dos halos de inibição para *C. albicans* .

Os escores de diâmetro dos halos de inibição para *C. albicans2* considerando as substâncias, apresentaram diferenças significativas utilizando o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$). Os dados são apresentados na Tabela 18. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de comparações múltiplas de Dunn (Gráfico 7 e Tabela 19).

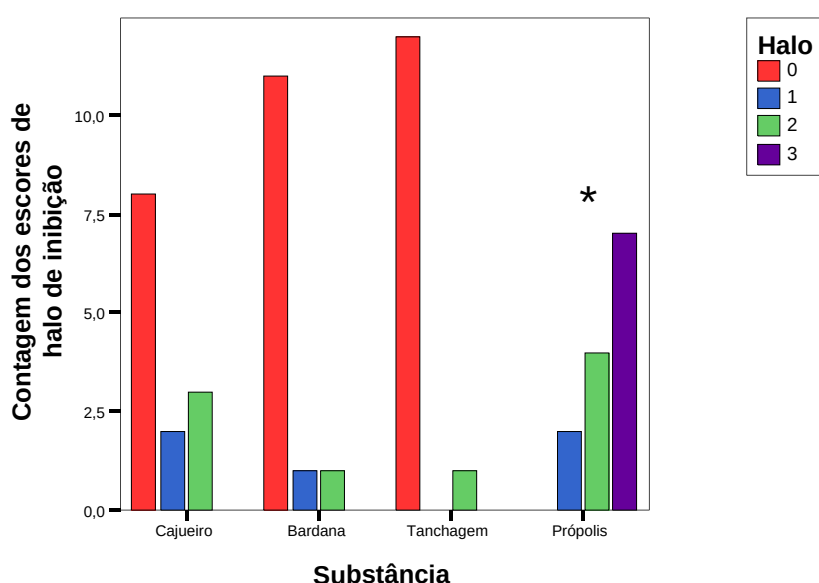
Tabela 18- Postos médios para os escores de halo de inibição para *C. albicans2* – a Teste de kruskal-Wallis

substâncias	N	Soma dos Postos	Postos Médios
Cajueiro	13	319,00	24,54
Bardana	13	251,00	19,01
Tanchagem	13	233,00	17,92
Própolis	13	575,00	44,23

KW=32,190 (corrigido para empates) – $p < 0,001^*$ - Diferenças significativas

Tabela 19- Diferenças entre os grupos – Comparações múltiplas de Dunn.

Comparação	Diferenças entre os postos	Significância
Cajueiro x Bardana	5,231	$P > 0,05$
Cajueiro x Tanchagem	6,615	$P > 0,05$
Cajueiro x Própolis	-19,692	$P < 0,01^*$
Bardana x Tanchagem	1,385	$P > 0,05$
Bardana x Própolis	-24,923	$P < 0,001^*$
Tanchagem x Própolis	-26,308	$P < 0,001^*$



* versus todos os grupos $p < 0,05$ - Significativo

Gráfico 7- Escores dos halos de inibição par *C. albicans2* .

6- DISCUSSÃO

A candidose bucal é uma infecção oportunista acometendo na maioria das vezes indivíduos imunocomprometidos. (NORD, 1990).

O avanço da medicina em técnicas de transplantes nos leva à indução de imunossupressão. Novos antibióticos de amplo espectro causam distúrbios na microbiota residente. Portadores de HIV tem distúrbios graves do sistema imunológico (KEUNETH; ROLSTON, 2003). A forma tradicional de tratamento é o uso de antifúngicos derivados poliênicos e azólicos (COSTA, 1996). Porém a possibilidade de efeitos colaterais deve ser considerada (LAGUNA et al., 1996). Embora poucas plantas sejam usadas como princípios curativos (COWAN, 1999), o uso de plantas medicinais e produtos naturais devem ser considerados uma alternativa válida de tratamento da candidíase bucal. A literatura sobre a ação antifúngica de produtos naturais e fitoterápicos é escassa, sendo que a maioria dos estudos verifica seu potencial como antibióticos, antiinflamatórios, colagogos e produtos dermatológicos. Produtos naturais como substâncias antimicóticas não são muito estudados. O efeito antifúngico de plantas como, estragão e tomilho já foram demonstrados (DUKE; 1985; BRANTNER et al., 1996). O eugenol extraído do cravo da índia tem efeito antifúngico (DUKE, 1985). O *Anacardiun occidentale* (cajueiro) foi estudado (AKIPENDU, 2001) quanto a sua ação antibacteriana, mostrando-se efetivo para bactérias G+ e G- (KUDI, 1999). Também a ação do cajueiro contra o *Helicobacte. pillori* foi eficiente (KUBO et al., 1999). Em um estudo (QUEIROZ, 1999) demonstrou a ação antifúngica do cajueiro no percentual de 64,3% contra o gênero *Candida* nas espécies: *C.albicans*, *C. stellatoidea*, *C.guilliermondiii*, *C. krusei* *C. tropicalis*. Na concentração de 5000mg/mL.

Nossos resultados com o cajueiro, *in vitro* demonstraram inibição de 11 amostras de *C. albicans* das 18 encontradas, 4 de *C. tropicalis* das 13 encontradas, sendo nossos resultados 38,9% e 30% de inibição respectivamente. Não tendo ação inibitória sobre as outras espécies de *Candida* descritas nos resultados. Talvez essa diferença com os resultados de (QUEIROS, 1999) a pesquisadora obteve uma ação inibitória de 64,3% na maior concentração por ela utilizada (5000ug/mL) se deva ao veículo usado por essa pesquisadora (solução aquosa); nós usamos solução alcoólica na concentração de 60% (comercial) no estudo de Queiroz foi 4% (preparo próprio).

No teste *in vivo* (recuperação de *C.albicans* da cavidade bucal de ratos), o cajueiro não foi eficaz, sendo o número de leveduras recuperadas superiores ao do controle. No exame histopatológico não foram encontradas hifas indicando não haver efetiva colonização. Isto talvez devido à ausência nos animais de fatores predisponentes ou a pouca patogenicidade da levedura (visto que na coleta nenhum paciente tinha candidose clinicamente detectável. A ação dos quimioterápicos como mostram os resultados foi considerada dentro da normalidade nos dois testes efetuados (disco impregnado e ATB Fungus).

Arctium lappa (bardana) possui ação antibiótica, antifúngica comprovada por Blanco (2003). Sua ação medicamentosa é antiga, porém de modo empírico sempre foi usada e pouquíssimo foi realizado até os dias de hoje em termos científicos. Apresenta boas qualidades nutricionais, sendo consumida não só no Brasil, como na Europa e Japão. Também é popularmente usada como depurativo e cicatrizante. No nosso experimento de 11 amostras de *Candida* 5 demonstraram sensibilidade a bardana sendo 2 *C.albicans* 1 *C. tropicalis* e 2 *C.parapsilosis*, com halos de inibição de crescimento superiores a 10mm.

No teste em tubo a redução ocorre no valor de 10^6 para 10 ufc/mL. No teste *in vivo* a bardana comportou-se com uma redução de 4 vezes o número ufc/mL.

A *Plantago major* (tanchagem) pertence a uma família de inúmeros membros, sendo conhecida em nosso país por nomes como tansagem e língua de vaca. Foi demonstrado por Zanon et al. (1999) seu efeito antiviral, contra o Herpes vírus. Também Hertland (1999) mostrou sua ação antibiótica contra o *Streptococcus pneumoniae* em camundongo. Estudos de Holetz et al. (2002) demonstraram sua ação antibacteriana e antifúngica. Samuelsen (2002) demonstrou seu uso na medicina popular como antiinflamatório, analgésico e cicatrizante. Em nosso experimento, nos testes *in vitro* a tanchagem teve ação antimicótica com 2 amostras de *C. albicans* e 1 *C. tropicalis*. Sendo que nos testes em tubo *C. albicans* e *C. tropicalis* foram inibidas completamente. O teste *in vivo* sua recuperação foi igual ao da bardana, isto é uma redução de 4 vezes o número de ufc/mL.

Sobre a substância natural própolis existem estudos de mais consistência sobre suas propriedades medicinais, porém como antimicótico não existem muitos trabalhos sobre sua ação. Suas propriedades antimicrobianas foram descritas por Vicente e Hirooka (1987). Seu poder de evitar a decomposição foi visto por Franco e Bueno (1999). Sua ação contra o *Streptococcus pyogenes* foi estudada por Vicente e Hirooka (1987). Sua ação antifúngica na concentração de 1.25mg/mL foi demonstrado por Cruz (1992). Em nossos testes a própolis foi o produto que teve a melhor ação antifúngica entre os analisados.

Nos testes *in vitro* provocou inibição em 72.2% das amostras de *C. albicans*, 84,6% das amostras de *C. tropicalis*, 66,6% das amostras de *C. parapsilosis*, com halos de inibição igual ou superior a 10mm. No teste em tubo o

crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi inibido completamente. No exame *in vivo* o menor índice de recuperação, isto é, a melhor ação antimicótica foi a da substância natural própolis.

Quando se investigam novos produtos ou técnicas, não se tem a pretensão de elucidar completamente o tema, mas estabelecer-se bases sólidas de um estudo com consistência. O uso de plantas medicinais e substâncias naturais como antimicóticos é um assunto novo que merecem mais atenção e pesquisas. Os resultados deste estudo sugerem uma sensibilidade de espécies de *Candida*, principalmente à própolis. Estudos posteriores são necessários para se determinar o uso de tais substâncias como agentes profiláticos e terapêuticos nas candidoses bucais, tornando-os mais uma arma na mão de cirurgiões dentistas no controle de infecções oportunistas tão freqüentemente encontradas na odontologia como as candidoses.

As comprovações científicas, seus resultados e ações merecem um estudo de maior profundidade, visto que seu baixo custo, efeitos colaterais de pouca intensidade e a grande biodiversidade de nosso país os justificam plenamente.

7- CONCLUSÕES

- O produto natural própolis apresentou melhor ação antifúngica frente às espécies de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. kerfyr*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.
- Os fitoterápicos cajueiro (*Anacardium occidentale*) e tanchagem (*Plantago major*) mostraram ação antifúngica frente às espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*.
- O fitoterápico bardana (*Arctium lappa*) mostrou ação antifúngica frente às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

.

REFERÊNCIAS

- AKIPENDU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v.72, n. 3, p.286-7, mar. 2001.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Post. Grad. Med. J.**, v.78, n.922, p.4555-9, Aug. 2002.
- ALLEN, C. M. et al. Chronic candidiasis of the rat tongue: a possible model for human median rhomboid glossitis. **J. Dent. Res.**, v.61, n.11, p.1287-91, Nov. 1982.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, p.367-373, 2000.
- AMARAL, J. A. et al. Effect of selected monoterpenes on the methane oxidation, denitrification and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p. 520-525, 1998.
- AYAFOR, J. F.; TCHUENDEM, M. H. K.; NYASSE, B. Novel bioactive diterpenoides from *Aframomum aulacocarpos*. **J. Nat. Prod.**, v.57, 917-23, 1994.
- BARRE, J. T. et al. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry.**, v.45, p.321-324, 1997.
- BATISTA, O. et al. Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereoensis*. **J. Nat. Prod.**, v.57, p. 858-861, 1994.
- BENDOVA, O. The killer phenomenon in yeast. **Folia Microbiol.**, v.31, n.5, p.422-33, 1986.
- BLANCO, R. A. Bardana (*Arctium lappa*). Disponível em: <www.jardimdeflores.com.br>. Acesso em: 20 nov. 2003.
- BRANTNER, A. et al. A. Antimicrobial activity of *Paliurus spina*. **Crist. Mill. J. Ethnopharmacol.**, v.52, p.119-122, 1996.
- BUDTZ-JORGENSEN, E. histopathology, Immunology and serology of oral yeast infections. diagnosis of oral candidosis. **Acta Odontol. Scan.**, v.48, n.1, p.37-43, Feb. 1990.
- CANNON, R. D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization or candidiasis? **J. Dent. Res**, v.74, n.5, p.1152-61, Maio 1995.
- CLARK, A. M. Natural products as a resources for new drugs. **Pharm. Res.**, v.13, 1996.
- COSTA, L. J. et al. Susceptibilidade de *Candida albicans* a antifúngicos: cepas isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.13, n.3, p.219-223, jul./set. 1999.

COTTER, G.; KAVANAGH, K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **Br. J. Biomed. Sci.**, v.57, n.3, p.241-9, 2000.

COWAN, M. M. Plant products and antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, n.4, p.564-582, Oct. 1999.

CRUZ, A. B. **Utilização do extrato alcoólico de própolis como inibidor do crescimento de fungos e leveduras na superfície de salames tipo italiano**. 1992. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1992.

DE CLERCK, E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.8, p.200-239, 1995.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. [S.l.] : Inc. boca Raton, Fla., 1985.

EISENBERG, D. M. et al. Unconventional medicine in the united States. Prevalence, costs ant patterns of use. **N. Engl. J. Med.**, v.328, p.246, 1993.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral candidosis. **Clin. Dermatol.**, v.18, n.5, p.553-62, Sept./Oct. 2000.

FOTOS, P. G.; HELLSTEIN, J. W.; VINCENT, S. D. Oral candidosis: clinical, histological and therapeutic features of 100 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.74, n.1, p.41-49, July 1992.

FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p.48-51, 1999.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y. Anti-AIDS agents. 11 betulinic acid and platnic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV of structurally related triterpenoids. **J. Nat. Prod.**, v.57, p.243-247, 1994.

GHANNOUM, M. A. Potential hole of phospholipasis in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, n.1, p.122-43, jan. 2000.

GHANNOUM, M. A. et al. Effects of octenicide and pirtenicide on adhesion of *Candida* species to human buccal epithelial cells in vitro. **Arch. Oral Biol.**, v.35, p.249-53, 1990.

GIRON, L. M. et al. Anticandidal activity of plants used for treatment of vaginitis in guatemala and clinical trial of a *Solanum nigrescens* preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.22, p.307-313, 1988.

HASLAN, E. Natural poliphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v.59, p.205-215, 1996.

HAYASHI, K.; KAMIYA, M.; HAYASHI, T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus abd HIV. **Planta Med.**, v.61, p.237-41, 1995.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbio**, v.9, n.12, p-591-6, Dec. 2001.

HETLAND, G. et al. Protective effect of *Plantago major* L pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scand J. Immunology**, v.52, p.348, 2000.

HOEGL, L.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidosis. **J. Mol. Med.**, v.74, n.3, p.135-42, Mar. 1996.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the brasilian folk medicine for the treatment of infectious disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HUFFORD, C. D. et al. Antimicrobial componds from *Petalostemum purpureum*. **J. Nat. Prod.**, v.56, p.1878-1889, 1993.

JORGE, A. O. C. **Efeitos da sialoadenectomia na presença de *Candida albicans* e candidose na cavidade bucal de ratos**. 1991. 235f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buço-Dental) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1991.

JORGE, A. O. C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com difeentes fatores predisponentes e indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.11, n.4, p.279-85, out./dez. 1997.

KAZMI, M. H. et al. An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. **Phytochemistry**., v.36, p.761-763, 1994.

KENEUTH, V. I.; ROLSTON, M. D. **Anderson Câncer Center, Houston, Texas**. Disponível em: <www.ccib.med.br/fungo21-1.html>. Acesso em: 25 fev. 2003.

KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Adherence of *Candida albicans* to human epithelial buccal cells. **Infect Immun.**, v.21, n.1, p.64-8, July 1978.

KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infect Immun.**, v.28, n.2, p.464-8, May 1980.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenilpropanoids. **J. Nat. Prod.**, v.56, p.220-226, 1993.

KUDI, A. C. et al. Screening of some Nigerian plants for antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.** v.67, n.2, p.225-8, nov.1999.

LACAZ, C. S. (Coord.). **Candidiases**. São Paulo: EPU, 1980. 190p.

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

LAGUNA, F.; VALENCIA, E.; POLO, R., et al. Ineficacia da anfotericina B oral en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea resistente a fluconazol en pacientes VIH-positivos. **Rev. Clin. Esp.**, v.196, n.12, p.878-9, dic.1996.

LANE, T.; GARCIA, J. R. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.34, n.5-6, p.217-20, May/June 1991.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.71, p.207-213, 1999.

LIMA, O. C. C.; SILVEIRA, F. R. X.; BIRMAN, E. G. Manifestações bucais de origem infecciosa em pacientes HIV-positivos ou com AIDS/ I- Doenças fúngicas. **Rev. ABO Nac.**, v.2, n.1, p.28-32, fev./mar. 1994.

MAGLIANI, W. et al. Yeast Killer systems. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, n.3, p.369-400, July 1997.

MARTIN, M. V.; CRAIG, G. T.; LAMB, D. J. An investigation of the role of hypha production in the pathogenesis of experimental oral candidosis. **Sabouraudia**, v.22, n.6, p.471-6, 1984.

MASON, T. L.; WASSERMAN, D. P. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.26, p.2197-2202, 1987.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1994. 180p.

McCOURTIE, J.; DOUGLAS, L. J. Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.45, p.6-12, 1984.

McINTYRE, G. T. Oral candidosis. **Dent. Update**, v.28, n.3, p.132-9, Apr. 2001.

MEYER, J. J. M. et al. Antiviral activity of galangin from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. **J. Ethnopharmacol.**, v.56, p.165-169, 1987.

NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L essential oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.675-678, 1999.

NEVILLE, B. W. et al. Doenças fúngicas e protozoárias. In: _____. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Trad. L.C. Moreira et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.6, p.158-75.

OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, p.71-4, 1990.

PENDRAK, M. L.; KLOTZ, S. A. Adherence of *Candida albicans* to host cells. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v.129, p.103-13, 1995.

QUEIROZ, M. L. F. **Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal**. 1998, 98f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1998.

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. **J. Ethnopharmacol.**, v.57, p.29-34, 1997.

REICHARDT, P. A.; SAMARANAYAKE, L. P.; PHILIPSEN, H. P. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: A review. **Oral Dis.**, v.6, n.2, p.85-91, Mar. 2000.

SAMARANAYAKE, L. P. ; MacFARLANE, T. W. Factors affecting the in vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. **Arch. Oral. Pathol.**, v.27, p.869-73, 1982.

SAMARANAYAKE, L. P. ; MacFARLANE, T. W. **Oral candidosis**. London: Wright, 1990. 265p.

SAMARANAYAKE, Y. U.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.2, p.398-429, Apr. 2001.

SAMPAIO, F. C. fitoterapia em Odontologia. In: **DAS PLANTAS medicinais aos fitoterápicos: abordagens científicas**. João Pessoa: UFPB, 1997.

SAMUELSEN, A. B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L.: a review. **J. Ethnopharmacology**, v.71, p.1-21, July 2000.

SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.48, n.1, p.27-36, Feb. 1990.

SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; BASTOS, J. K. et al. Atividade antibacteriana de extratos vegetais. **Rev. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.12, p.49-69, 1990.

SANTOS, E. B. et al. Influência do uso de próteses removíveis na presença de *Candida* na cavidade bucal. **Publicatio UEPG – Biological and Health Science**, Ponta Grossa, v.5, n.1, p. 73-80, 1999.

SCHULTES, R. E. The kingdom of plants. In: THOMSON, W. A. R.(Ed.). **Medicines from earth**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1978. p.208

SHERMAN, R. G. et al. Oral candidosis. **Quintessence Int**, v.33, n.7, p.521-32, July/Aug. 2002.

STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol. Scand.**, v.48, n.1, p.3-10, Feb. 1990.

TAKAKURA, N. et al. a novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. **Microbiol. Immunol.**, v.47, n.5, p.321-6, 2003.

THOMSON, W. A. R.; (Ed). **Medicines from the earth**. United Kingdom: McGraw-Hill Book Co. Maidenhead, 1978.

THORNES, R. D. Clinical and biological observations associated with coumarins. In: O'KNENDY, R. ; THORNES, R. D. (Ed.). **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Wiley & Sons, 1997. p.256.

TINTO, A. C. et.al. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

TSUCHIYA, H. et al. Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.**, v.50, p.846-849, 1994.

VICENTE, E.; HIROOKA, E. Y. Estudos preliminares da atividade antimicrobiana de própolis. **Semina**, v.8, n.2, p.76-79, 1987.

WEBB, B. C. et al. *Candida* – Associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. **Aust. Dent. J.**, v.43, n.1, p.45-50, Aug. 1998.

WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **Oral Dis.**, v.16, n.1, p.3-11, Jan. 2000.

YAO, X. J.; WAINBERG, M. A.; PARNIAK, M. A. mechanism of inhibition of HIV-1 infection by purified extract of *Prunella vulgaris*. **Virology**, v. 187, n.1, p.56-62, Mar.1992.

ZANON, S. M. et al. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v.41, n.52, p.59-62, Apr./June 1999.

ANEXO A - Termo de Consentimento

ANEXO B - Meios de Cultura - Ágar Fubá

ANEXO C - Prova de Assimilação de Carboidratos

ANEXO D - Certificados de Análise dos Produtos Utilizados

**ANEXO E - Tabela CECOM-Centro de Controle e Produtos para
Diagnóstico Ltda**

ANEXO F - ATB Fungus

ANEXO G - Declaração da Propesp quanto à Pesquisa