

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

ROSANA MARQUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS NATURAIS E
PRÓPOLIS SOBRE *CANDIDA spp.* – ESTUDO *IN VITRO***

**PONTA GROSSA
2012**

ROSANA MARQUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS NATURAIS E
PRÓPOLIS SOBRE *CANDIDA spp.* – ESTUDO *IN VITRO***

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

Orientador : Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Janaína Habib Jorge

**PONTA GROSSA
2012**

- S586a Silva, Rosana Marques
Avaliação da atividade antifúngica de extratos naturais e própolis sobre *Candida spp*: estudo *in vitro* / Rosana Marques da Silva. Ponta Grossa, 2012.
71f.
Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração : Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti
Co-orientadora : Prof^a Dr^a Janaina Habib Jorge
1. Candida. 2. Estomatite sob Prótese. 3. Antifúngicos.
4. Candidíase. 5. Plantas Medicinais. I. Pilatti, Gibson Luiz.
II. Jorge, Janaina Habib. III. T.

CDD : 617.6

ROSANA MARQUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS NATURAIS E
PRÓPOLIS SOBRE *CANDIDA spp.* – ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti - Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Pero Vizoto
Universidade Estadual de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Nara Hellen Campanha
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES

Rosana Marques Silva

NASCIMENTO 16.05.1986

Ceres – Goiás

FILIAÇÃO

Divina Marques Silva
Antônio da Silva

2005 – 2009

Curso de Graduação em Odontologia –
Universidade Estadual de Ponta Grossa
– Paraná.

2010 – 2012

Curso de Pós-Graduação em
Odontologia Universidade Estadual de
Ponta Grossa (UEPG), nível de
Mestrado em Odontologia - Área de
Concentração em Clínica Integrada –
Materiais Dentários, Ponta Grossa –
Paraná.

Dedico este trabalho primeiramente a *Deus*, meu
refúgio nos momentos difíceis. Aos meus pais
Antônio da Silva e *Divina Marques Silva*,
essenciais na minha vida, e ao meu marido
Henrique Fiquerôa, que sempre esteve ao meu
lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por tudo de maravilhoso que me foi concedido, e todas as oportunidades e graças a mim oferecidas. Obrigada Senhor por estar sempre ao meu lado guiando os meus passos e meus caminhos, não me deixando desistir em nenhum momento de fraqueza. Obrigada Senhor por me dar a força, perseverança e sabedoria necessárias para o meu sucesso.

A toda *minha família*, principalmente ao meu irmão *Roberto Marques Silva*, o maior responsável por eu ter estudado na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Aos *meus pais*, pelo carinho, atenção e auxílio durante todo o período do mestrado.

Aos meus sogros, *Rosicler Fiquerôa e Edilson Fiquerôa*, que estiveram sempre ao meu lado e me deram apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. *João Carlos Gomes*, por todo seu carinho e dedicação a este programa de pós-graduação, e por todos os ensinamentos por ele transmitidos, contribuindo para formação de profissionais cada vez mais competentes.

A Prof.^a Dr.^a *Osnara Maria Mongruel Gomes*, por seu apoio incondicional, nos ajudando e nos orientando sempre.

A Prof.^a Dr.^a *Janaina Habib Jorge*, por sua dedicação e orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Gibson Luiz Pilatti*, por assumir a orientação deste trabalho e dar continuidade a execução deste projeto.

A doutoranda *Yileng Tay* por todo o seu apoio, que foi de extrema importância na realização deste trabalho.

A *todos os professores* do curso de Odontologia e do programa de Pós-graduação, que fazem parte de toda minha formação profissional e pessoal.

A *todos os meus colegas* de turma por todos os momentos bons e ruins vividos, por estarem sempre ao meu lado, por compartilhar idéias, por sua amizade. Especialmente à minha madrinha *Bruna Fortes Bittencourt* pelo seu incentivo, pois ela foi essencial na minha decisão em realizar este curso de mestrado.

Aos *funcionários da UEPG*, pela grande ajuda principalmente a *Janaina*, responsável técnica pelo laboratório de microbiologia e à *Morgana*, secretária da pós-graduação, pela sua amizade e apoio.

A *Universidade Estadual de Ponta Grossa* e a *Capes*, pelo apoio financeiro.

A *todas as pessoas* que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nunca deixe que digam que não vale à
pena acreditar num sonho de que se tem, ou
que seus planos nunca vão dar certo, ou que
você nunca vai ser alguém ...Confie em si
mesmo, quem acredita sempre alcança...”

Renato Russo

Silva, RM. Atividade antifúngica de extratos naturais e própolis sobre *Candida spp.* – Estudo *in vitro*. Dissertação - Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2012.

RESUMO

A estomatite protética é uma reação inflamatória dos tecidos bucais que matem contato direto com as próteses. Para o tratamento desta doença, a utilização de extratos naturais é promissora, entretanto, os estudos da atividade antimicrobiana de diferentes extratos, devem ser ampliados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica de extratos naturais de plantas medicinais e de própolis sobre cepas de *Candida spp.*, principal agente causador da estomatite protética. Para isso, foram utilizados extratos hidroalcóolicos de *Malva sylvestris* e *Azadirachta indica* (neem), nas concentrações de 1:1, 1:2 e 1:4. O extrato hidroalcoólico de própolis nas concentrações de 20% e 30% também foi utilizado. Os testes foram feitos em duplicata. Os extratos foram impregnados em discos de papel estéreis, e os halos de inibição foram medidos em mm com um paquímetro digital. As placas foram mantidas em estufa a temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ até o desenvolvimento das colônias. A atividade antifúngica foi avaliada após 48 h nos diferentes tratamentos. Posteriormente, o teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) também foi realizado. Os dados foram avaliados estatisticamente com níveis de significância de $p < 0,05$ e análise descritiva. Nos testes de difusão em disco, os extratos não se mostraram efetivos. Os extratos que inibiram acima de 50% do crescimento fúngico foram considerados efetivos. A CIM da própolis para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* foi de 30% e para *C. tropicalis* foi de 20%. A malva não apresentou porcentagem de inibição acima de 50% para nenhuma cepa avaliada. A CIM para o neem foi de 1:1 para *C. glabrata* e de 1:2 para *C. krusei* e *C. tropicalis*, e não apresentou inibição maior que 50% para *C. albicans*. Os resultados obtidos mostram que as plantas em estudo e a própolis tiveram baixa efetividade frente às cepas estudadas. Estudos futuros da ação dos extratos destas plantas devem ser realizados.

Palavras chave: Candida. Estomatite Sob Prótese. Antifúngicos. Candidíase. Plantas Medicinais.

Silva, RM. Atividade antifúngica de extratos naturais e própolis sobre *Candida spp.* – Estudo *in vitro*. Dissertação - Mestrado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2012.

ABSTRACT

The denture stomatitis is an inflammation of the oral tissues which keeps direct contact with the prostheses. For the treatment of this disease, the use of natural extracts is promising, however, studies of their antimicrobial activity of different extracts should be expanded. Thus, the aim of this study is to evaluate *in vitro* antifungal activity of natural extracts of medicinal plants and propolis on strains of *Candida spp.* For this we used hydroalcoholic extracts of *Malva sylvestris* (malva) and *Azadirachta indica* (neem) at concentrations of 1:1, 1:2 and 1:4. The hydroalcoholic extract of propolis at concentrations of 20% and 30% was used. The tests were done in duplicate. The extracts were impregnated in sterile paper disks and “inhibition zone” were measured in mm with a caliper. The plates were incubated at a temperature of 37 ± 0.5 ° C until the development of the colonies. The antifungal activity was evaluated after 48h in the different treatments. Subsequently, the broth microdilution test for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) was also performed. Data were evaluated statistically with significance levels of $p < 0.05$ and descriptive analysis. In disk diffusion testing, the extracts were not effective. The extracts which inhibited over 50% of fungal growth were considered effective. The MIC of propolis to *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* was 30% and to *C. tropicalis* was 20%. The malva showed no inhibition percentage above 50% for any strain evaluated. The MIC for neem was 1:1 for *C. glabrata* and *C. krusei*, and 1:2 to *C. tropicalis*. This plant didn't showed inhibition to greater than 50% to *C. albicans*. The results show that plants and propolis under study had limited effectiveness against the strains studied. Future studies of the action of extracts of these plants should be conducted.

Keywords: Candida. Stomatitis Denture. Antifungals. Candidiasis. Medicinal Plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- a – <i>Malva sylvestris</i> ; b – Própolis bruta; c – <i>Azadirachta indica</i> (neem).....	29
Figura 2	- Exemplo das espécies de <i>Candida</i> diferenciadas em CHROmagar.....	32
Figura 3	- Discos de papel estéreis impregnados com os extratos (própolis 20% e 30%) e com o controle positivo (nistatina suspensão oral)	34
Figura 4	- Espectrofotômetro calibrado em 580 nm para ajustar a turvação do inóculo	34
Figura 5	- Inóculo preparado na concentração de $1-3 \times 10^4$ UFC/mL.....	35
Figura 6	- Disposição dos discos nas placas, sendo em a – Disco A impregnado com extrato de própolis a 20%; disco B extrato na concentração de 30%; disco C controle (nistatina); em b – Disco A impregnado com extrato de malva ou neem 1:1; disco B extrato na concentração de 1:2; C extrato na concentração 1:4 e em D controle (nistatina).....	35
Figura 7	- Distribuição da microplaca utilizada para determinação da CIM dos extratos dos diferentes produtos frente a 4 cepas de <i>Candida spp.</i>	37
Figura 8	- A – diluição do extrato de própolis; B – diluição do extrato de malva; C – diluição do extrato de neem.....	38
Figura 9	- A – Discos impregnados com extrato de própolis 20%; B – discos impregnados com extratos de própolis 30%; C – controle positivo (Nistatina). a – <i>C. glabrata</i> ; b – <i>C. krusei</i> ; c – <i>C. albicans</i> ; d – <i>C. tropicalis</i>	41
Figura 10	- A – Discos impregnados com extrato de malva 1:1; B – discos impregnados com extrato de malva 1:2; C – disco impregnado com extrato de malva 1:4; D – disco impregnado com controle positivo (nistatina). a – <i>C. glabrata</i> ; b – <i>C. krusei</i> ; c – <i>C. albicans</i> ; d – <i>C. tropicalis</i>	41

Figura 11	- A – Discos impregnados com extrato de neem 1:1; B – discos impregnados com extrato de neem 1:2; C – disco impregnado com extrato de neem 1:4; D – disco impregnado com controle positivo (nistatina). a – <i>C. glabrata</i> ; b – <i>C. krusei</i> ; c – <i>C. albicans</i> ; d – <i>C. tropicalis</i>	42
Figura 12	- Halos de inibição do crescimento formados com o miconazol e nistatina. A e C – Miconazol; B e D – Nistatina.....	43
Gráfico 1	- Diferença estatística entre as médias do controle (nistatina) em relação às diferentes espécies de <i>Candida</i> . Em 1 – diferença entre <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> não significativa. Em 2 – diferença entre <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ($p<0,01$) significativa. Em 3 – diferença entre <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> não significativa. Em 4 – diferença entre <i>C. glabrata</i> e <i>C. krusei</i> ($p<0,01$) significativa. Em 5 – diferença entre <i>C. glabrata</i> e <i>C. tropicalis</i> não significativa. Em 6 – diferença entre <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i> ($p<0,01$) significativa.....	43
Gráfico 2	- Porcentagem de inibição do extrato de própolis frente às diferentes espécies de <i>Candida</i>	46
Gráfico 3	- Porcentagem de inibição do extrato de malva frente às diferentes espécies de <i>Candida</i>	46
Gráfico 4	- Porcentagem de inibição do extrato de neem frente às diferentes espécies de <i>Candida</i>	47

LISTA DE TABELAS

Quadro 1	- Produtos naturais utilizados para obtenção dos extratos hidroalcólicos.....	31
Tabela 1	- Atividade antimicrobiana (mm) do extrato de própolis 20% e 30%, diante das diferentes cepas de <i>Candida</i>	40
Tabela 2	- Atividade antimicrobiana (mm) do extrato de malva 1:1, 1:2 e 1:4, diante das diferentes cepas de <i>Candida</i>	40
Tabela 3	- Atividade antimicrobiana (mm) do extrato de neem 1:1, 1:2 e 1:4, diante das diferentes cepas de <i>Candida</i>	40
Tabela 4	- Porcentagem (%) de inibição do extrato de própolis em comparação com o controle (nistatina) frente a <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i>	44
Tabela 5	- Porcentagem (%) de inibição do extrato de malva em comparação com o controle (nistatina) frente a <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i>	45
Tabela 6	- Porcentagem (%) de inibição do extrato de neem em comparação com o controle (nistatina) frente a <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i>	45
Tabela 7	- Concentração inibitória mínima dos produtos naturais.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

spp.	várias espécies do mesmo gênero
OMS-FDI	Organização Mundial de Saúde – Federação Dentária Internacional
C.	<i>Candida</i>
S.	<i>Streptococcus</i>
sp.	uma espécie do mesmo gênero
A.	<i>Azadirachta</i>
L.	<i>Lactobacillus</i>
B.	<i>Bacillus</i>
ASD	Ágar Saboura ud Dextrose
ANOVA	análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
h	horas
atm	atmosfera
mm	milímetros
μl	microlitros
UFC/mL	Unidades formadores de colônia por mililitros
CIM	Concentração Inibitória Mínima

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
p	significância
:	para
°C	graus Celsius
±	mais ou menos
®	marca comercial de medicamentos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	ESTOMATITE PROTÉTICA.....	20
2.2	ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS PARA O TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA	23
2.3	<i>CANDIDA spp.</i>	25
2.4	TRATAMENTOS ALTERNATIVOS PARA ESTOMATITE PROTÉTICA	26
3	PROPOSIÇÃO.....	30
3.1	PROPOSIÇÃO GERAL	30
3.2	PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS DOS PRODUTOS NATURAIS	31
4.2	MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	32
4.3	OBTENÇÃO DAS COLÔNIAS DE <i>CANDIDA spp.</i>	31
4.4	MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO (DISCO DE PAPEL).....	33
4.5	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	36
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
5	RESULTADOS.....	40
5.1	MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO (DISCO DE PAPEL)	40
5.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	44
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICE A	63

1 INTRODUÇÃO

Os fungos vivem, na maioria das vezes, numa relação de comensalismo com os seres humanos, colonizando diferentes *habitats*, principalmente pele e mucosas (McMullan-Vogel et al.¹ 1999). A *Candida albicans* é normalmente um comensal na cavidade bucal e geralmente não causa problemas para a saúde em geral de indivíduos saudáveis, no entanto, em condições especiais pode causar infecções (Akpan, Morgan² 2006). A existência de espécies de *Candida spp.* comensais em indivíduos saudáveis, dentados, varia de 20% a 50% (Samaranayake, Samaranayake³ 2001). Todavia, as infecções causadas por esses microrganismos tem aumentado consideravelmente. Vários estudos demonstraram que a *Candida spp.* tem apresentado vários fatores de virulência em condições adequadas (Quirynen et al.⁴ 1990).

Os idosos, no Brasil, encontram-se em precárias condições de saúde bucal, estando abaixo da média internacional e da meta número 5 da OMS-FDI para o ano 2000 (Campostrini et al.⁵ 2007). Este quadro tem contribuído com o aumento de patologias relacionadas à virulência de fungos comensais em pacientes debilitados, tais como a estomatite protética (Akpan, Morgan² 2001; Colussi, Torres⁶ 2002).

De acordo com Budtz-Jørgensen e Bertram⁷ (1970), a estomatite protética é uma reação inflamatória dos tecidos bucais que mantém contato direto com as próteses, sendo bastante comum em idosos. Além disso, esta doença pode também estar associada ao uso noturno da prótese, trauma, presença de biofilme dentário, falta de higiene, dieta inadequada, uso de antibióticos, reação alérgica ao material de base da prótese, condições de predisposição sistêmica (Budtz-Jørgensen, Bertram⁶ 1970), deficiências nutricionais, doenças metabólicas, terapia com fármacos antibacterianos, deficiência orgânica das glândulas salivares e imunossupressão (Kleinegger et al.⁸ 2001).

Grande número de leveduras é comumente encontrado na superfície interna de próteses removíveis e, assim, pode-se dizer que esta pode atuar como um reservatório, permitindo que as espécies de *Candida* infectem continuamente a mucosa (Casaroto, Lara⁹ 2010), isto faz com que os pacientes usuários de próteses dentárias apresentem uma maior prevalência e susceptibilidade ao desenvolvimento da candidose bucal, apresentando sinais clínicos e laboratoriais positivos para a

infecção (Paiva et al.¹⁰ 2009). A colonização de *Candida spp.* nas superfícies de próteses é o primeiro passo para levar ao desenvolvimento de processos infecciosos (Cannon, Chaffin,¹¹ 1999; Chandra et al.¹² 2001, Ramage et al.¹³ 2004). Dentre as diversas espécies de *Candida* encontradas na cavidade bucal, a que possui maior ocorrência nas situações de inflamação é a *Candida albicans* (Paiva et al.¹⁰ 2009), no entanto, diversos estudos tem relatado a presença de outras espécies de *Candida* menos virulentas, tais como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis* (Samaranayake, Samaranayake³ 2001; Coleman et al.¹⁴ 1997). Samaranayake e Samaranayake³ (2001) encontraram a *C. glabrata* como sendo a segunda espécie mais prevalente, sendo frequentemente isolada das superfícies acrílicas de próteses e da mucosa palatal. Por outro lado, Paiva et al.¹⁰ (2009) encontraram a *C. tropicalis* 21,73% como segunda espécie mais prevalente, seguida pela *Candida guilliermondii* com 4,34% de incidência.

Os principais antifúngicos usados no tratamento da candidose são os polienos (como nistatina e anfotericina B), os imidazóis (como clotrimazol e miconazol) e os triazóis (como o fluconazol e itraconazol). Geralmente, o tratamento inicial é feito com um agente tópico. Nistatina e miconazol são as drogas de escolha inicial. Caso a terapêutica tópica não apresente resultados, é iniciado o tratamento sistêmico, sendo o fluconazol a droga mais prescrita (Hunter et al.¹⁵ 1998; Patton et al.¹⁶ 2001; Patton, Shugars,¹⁷ 2003). Atualmente, estes antifúngicos apresentam uso limitado devido a fatores como baixa potência, baixa solubilidade, toxicidade e o aparecimento de cepas resistentes, havendo altos índices de recidivas (Duarte et al.¹⁸ 2005). A resistência aos medicamentos está associada com o aumento da atividade metabólica dos biofilmes de *Candida spp.* quando estão em desenvolvimento. Dessa forma, podemos dizer que isto está relacionado com o processo de maturação do biofilme. Este, formado pelas diversas espécies de *Candida*, foi considerado de 30 a 200 vezes mais resistente que as células planctônicas frente a diversos agentes antifúngicos (Seneviratne et al.¹⁹ 2008).

Esses inconvenientes associados ao uso dos antifúngicos convencionais destacam a importância da indicação terapêutica de produtos naturais como método alternativo e de baixo custo (Alves et al.²⁰ 2009). Há um interesse crescente no uso destes produtos, os quais tem se mostrado como uma terapêutica promissora no campo farmacológico, pois apresentam como grande vantagem a

escassez de efeitos colaterais, sendo, às vezes, relatada apenas uma pequena ardência na mucosa, quando comparada aos produtos sintéticos (Drumond et al.²¹ 2004). Neste aspecto, Paiva et al.¹⁰ (2009) verificaram que nenhum paciente que utilizou a *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) como terapêutica para a candidose apresentou reações adversas no decorrer do tratamento, já sendo uma vantagem do fitofármaco sobre outros medicamentos que estão atualmente no mercado, pois no mesmo estudo, os autores verificaram que 40% dos pacientes que utilizaram antifúngicos convencionais relataram ter tido reações adversas no decorrer do tratamento. Trinta por cento relataram ter tido náuseas logo após a aplicação do produto nas áreas lesionadas e 10% referiram dor epigástrica.

Na busca por novos fitoterápicos, destaca-se a *Malva Sylvestris*, planta da família *Malvaceae*, muito usada pela medicina popular na América Latina, incluindo o Brasil, por suas propriedades antiinflamatórias e antissépticas (de Souza et al.²² 2004), além de promover a melhora na cicatrização de feridas (Tadeg et al.²³ 2005). Por sua vez, a espécie *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como neem, é uma árvore nativa da Índia e Ásia, característica de clima tropical (Verma et al.²⁴ 2009). Devido a sua ampla gama de propriedades medicinais, o neem está sendo muito utilizado na medicina homeopática (Subapriya, Nagini,²⁵ 2005). O extrato de *Azadirachta indica* é um poderoso agente inibidor frente a microrganismos infecciosos que causam doenças na cavidade bucal (Verma et al.²⁴ 2009). Na Índia e na África, os cirurgiões-dentistas tem aprovado esta prática por acreditarem que o extrato do neem realmente previne o aparecimento de doenças periodontais (Verma et al.²⁴ 2009). Contudo, o extrato de neem aquoso não parece ter um efeito fungicida contra as espécies de *Candida* devido às baixas concentrações dos compostos bioativos, mas esse efeito pode aumentar se agregado ao álcool (Casaroto, Lara,⁹ 2010). Outro agente natural alvo de pesquisas é a própolis. Santos et al.²⁶ (2008) verificaram que o gel de própolis é eficiente para o tratamento tópico da estomatite protética, no entanto, mais estudos são necessários para verificar se essa atividade antifúngica também é efetiva *in vivo*. A própolis possui tanto atividade antifúngica como antiinflamatória. O gel com propriedade mucoadesiva promove uma maior retenção do produto na área afetada, levando a um prolongado período de ação terapêutica. O gel de própolis brasileiro pode ser considerado como uma escolha alternativa para casos recorrentes de estomatite protética (Santos et al.²⁶ 2008).

De acordo com a literatura, a utilização de extratos naturais na Odontologia parece promissora, entretanto, os estudos da atividade antimicrobiana de diferentes extratos devem ser ampliados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica dos extratos hidroalcólicos de *Malva Sylvestris*, *Azadirachta indica* (neem) e própolis, em diferentes concentrações, sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Apesar das possíveis aplicações destes extratos, nenhum estudo foi encontrado na literatura utilizando-os em diferentes concentrações para a inativação de espécies de *Candida* ou para o tratamento da estomatite protética, justificando a escolha destes produtos naturais no presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA

A estomatite protética é caracterizada como sendo uma inflamação e eritema das áreas da mucosa oral cobertas pelas próteses totais (Arendorf, Walker,²⁷ 1987; Wilson²⁸ 1998; Reichart²⁹ 2000). Vários estudos sugerem que até dois terços ou mais dos indivíduos que usam as próteses totais podem apresentar estomatite protética (Ramage et al.¹³ 2004; Reichart,²⁹ 2000; Budtz-Jorgensen³⁰ 1978; Webb et al.³¹ 1998). Apesar de sua frequência, ela é assintomática, na maioria das vezes. Apenas uma minoria dos pacientes sente dor, prurido ou sensação de ardor, sendo a doença primariamente diagnosticada durante o exame físico rotineiro, pela presença de inflamação ou hiperplasia dos tecidos da mucosa abrangidos pela prótese total (Wilson²⁸ 1998; Budtz-Jørgensen³² 1974).

Ela foi primeiramente classificada por Newton³³ (1962) de acordo com sua aparência clínica em: Tipo I - inflamação ou hiperemia localizada; Tipo II - inflamação ou hiperemia, simples ou generalizada visto mais como um eritema difuso, envolvendo uma parte ou toda a mucosa coberta pela prótese; Tipo III - granular (hiperplasia papilar inflamatória) comumente envolvendo a parte central do palato duro e as cristas alveolares. Os tipos mais comuns encontrados são os tipos I e II, e envolvem a resposta à estimulação epitelial inflamatória crônica secundária à colonização de levedura e, possivelmente, a baixo grau de trauma local, resultante de próteses mal ajustadas.

A severidade da estomatite protética tem sido correlacionada com a presença de colonização por leveduras na superfície da prótese, principalmente *C. albicans* (Budtz-Jorgensen³⁴ 1981). O processo inflamatório da estomatite favorece a colonização de *Candida spp.* (Barbeau et al.³⁴ 2003), sendo que esta é a forma mais comum de candidíase oral, localizando-se principalmente no palato (Salerno et al.³⁶ 2011). Arikan et al.³⁷ (1995) verificaram que a *C. albicans* tem maior significância na etiologia da estomatite protética do que o trauma.

O que se tem discutido atualmente é que a etiologia da estomatite protética seja multifatorial, tendo-se uma série de fatores associativos ao invés de uma única origem (Wilson²⁸ 1998; Castro et al.³⁸ 2006), tais como má higienização oral, uso noturno da prótese, trauma, fumo, condições sistêmicas, reações alérgicas

aos materiais de base das próteses e infecções fúngicas e bacterianas, principalmente *C. albicans* (Budtz-Jørgensen, Bertram⁷ 1970; Shulman et al.³⁹ 2005).

Carvalho de Oliveira et al.⁴⁰ (2000) avaliaram pacientes desdentados totais bimaxilares portadores de próteses muco-suportadas, com presença ou não de estomatite protética. Não foi possível relacionar essas lesões a um único fator causal, pois estatisticamente apenas um fator não foi significativo para ocorrência dessa alteração. Fatores como período de edentulismo, número e tempo de uso das próteses, uso contínuo, conservação, presença de placa e higiene bucal, avaliados isoladamente, não puderam ser responsáveis pelas alterações da mucosa de suporte.

Apesar dos resultados dos estudos anteriormente citados, a má higiene das próteses é aceita como o fator de risco mais crítico para o desenvolvimento da estomatite protética. Vários autores demonstraram uma forte associação entre a higiene ruim e a prevalência desta doença (Budtz-Jørgensen, Bertram⁷ 1970; Kulak-Ozkan et al.⁴¹ 2002; Dikbas et al.⁴² 2006; Cross et al.⁴³ 2004; Baran, Nalçaci,⁴⁴ 2009). Estes estudos relataram que muitos usuários de próteses apenas escovam as próteses, e não utilizam outros métodos de higienização das mesmas, tais como a imersão em soluções desinfetantes, como o hipoclorito de sódio, rotineiramente. Estes pacientes não removem as próteses antes de dormir, e realizam higiene deficiente, aumentando os riscos de desenvolver estomatite protética. Estes fatores podem favorecer o crescimento de leveduras oportunistas, como *Candida spp.* (Budtz-Jørgensen, Bertram⁷ 1970; Kulak-Ozkan et al.⁴¹ 2002; Dikbas et al.⁴² 2006; Cross et al.⁴³ 2004; Baran, Nalçaci,⁴⁴ 2009).

Em um estudo realizado por Marchini et al.⁴⁵ (2006), os autores analisaram os hábitos de higiene dos usuários de próteses totais e as condições dos tecidos orais. Eles verificaram a prevalência de estomatite protética em 19,5% dos casos. Esta enfermidade mostrou uma relação estatística com destreza manual reduzida, mostrando que a maioria dos casos estava relacionada com uma má higienização da prótese total.

Kulak-Ozkan et al.⁴¹ (2002) realizaram um estudo com o objetivo de determinar os hábitos de higiene oral, limpeza da prótese, presença de leveduras e estomatite protética em idosos usuários de próteses totais. Na maioria dos indivíduos a higiene da prótese foi extremamente deficiente. A relação entre estomatite protética e presença de leveduras foi estatisticamente significativa. A

incidência desta doença nos idosos com pobre higiene oral foi de 88%, mostrando mais uma vez a relação entre uma higiene bucal ruim e a prevalência da estomatite protética.

Campos et al.⁴⁶ (2008) verificaram que o biofilme encontrado nos pacientes com estomatite protética é polimicrobiano. Foram encontradas diferenças entre os biofilmes de pessoas doentes e saudáveis, o que sugere a existência de um biofilme específico envolvendo os doentes com estomatite protética. Dentre estas diferenças pode-se citar a presença de *Prevotella sp.*, apenas nos pacientes doentes. *C. albicans* foi encontrada em ambos pacientes, no entanto, naqueles com estomatite protética a população desta levedura cresceu rapidamente.

Evren et al.⁴⁷ (2011) realizaram um estudo analisando a associação entre status socio-econômico, higiene oral, estomatite protética e condição bucal em pessoas idosas residentes em diferentes lugares (casas financiadas completamente pelo governo, casas financiadas por organizações de auxílio a idosos e pelo governo, com renda limitada ou com boa renda) . Os autores encontraram uma relação direta entre a estomatite protética e precários hábitos de higiene. Da mesma forma, Sadig⁴⁸ (2010) concluiu que os fatores predisponentes à estomatite protética estão associados com os métodos de higiene da prótese e o uso desta durante o sono.

Por se tratar de uma reação inflamatória, e este processo variar, dependendo do tipo de tecido envolvido e da intensidade e concentração das forças transmitidas a este (Nakashima et al.⁴⁹ 1994), acredita-se que o trauma causado por uma dentadura instável possa ser uma das causas da estomatite protética. Em idosos desdentados, para garantir uma melhor saúde oral da mucosa, as próteses mandibulares podem ser apoiadas por no mínimo dois implantes, tendo maior estabilidade, o que evita o trauma na mucosa oral, podendo ser eficaz no controle da estomatite protética (Emami et al.⁵⁰ 2008). Em estudo realizado por Nakashima et al.⁴⁹ (1994), os autores desenvolveram uma prótese sem qualquer compressão mecânica da mucosa palatal de ratos e realizaram uma limpeza artificial do palato e da base da prótese. Os resultados mostraram não haver qualquer alteração inflamatória nos tecidos de suporte da prótese dentro do período do experimento.

2.2 ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS PARA O TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA

A estratégia terapêutica para a estomatite protética inclui o uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos (com remissão dos sintomas em 12 a 14 dias (Webb et al.³¹ 1998)), o uso de desinfetantes, a irradiação com micro-ondas e o controle da placa presente na prótese e na mucosa oral (Salerno et al.³⁶ 2011).

Arikan et al.³⁷ (1995) investigaram os efeitos de diferentes terapêuticas no tratamento da estomatite protética, utilizando antifúngico sistêmico (50 mg de fluconazol diariamente durante duas semanas), antifúngico sistêmico mais aplicação tópica de solução desinfetante (clorexidina 2% duas vezes ao dia) na superfície das próteses e colocação de novas próteses sem medicação. Nos grupos tratados com fluconazol, houve uma supressão da concentração de leveduras de *C. albicans* na mucosa palatal e uma diminuição da inflamação. Este resultado indica que o fluconazol tem um efeito contra *Candida*, no entanto, os pacientes apresentaram uma recorrência da infecção duas semanas após o término do tratamento. O grupo tratado apenas com fluconazol apresentou uma recorrência maior que o grupo tratado com fluconazol e clorexidina.

Antifúngicos tópicos em suspensão, como nistatina, anfotericina B, ou natamicina e miconazol, tem sido eficazes quando usados para o tratamento desta infecção (Budtz-Jørgensen³² 1974). No entanto, as taxas de recorrência são elevadas e as prescrições de tratamento tendem a ser prolongadas (Bergendal⁵¹ 1982). Lyon et al.⁵² (2006) concluíram que o fluconazol possui a capacidade de diminuir a habilidade de aderência e produção enzimática da *C. albicans*. Por outro lado, algumas espécies de *Candida*, como a *C. glabrata* e *C. krusei*, apresentam resistência intrínseca aos azóis, em especial o fluconazol (Pappas et al.⁵³ 2004; Sanglard, Odds,⁵⁴ 2002).

Na estomatite do tipo III, as lesões de inflamação geralmente regridem, mas a hiperplasia persiste. Enxaguar a boca com uma solução de gluconato de clorexidina a 0,2% reduz a inflamação e o número de leveduras que se estabelecem na mucosa e nas próteses (Budtz-Jørgensen, Løe⁵⁵ 1972). A clorexidina também pode ser eficiente no tratamento da estomatite do tipo II de Newton (Uludamar et al.⁵⁶ 2011).

A ocorrência de recidivas alguns meses após o término do tratamento é comum (Pappas, Ray⁵⁷ 1999). Cross et al.⁴³ (2004) analisaram a taxa de recorrência de estomatite protética e a persistência da *Candida*, tratando os pacientes com itraconazol. Os autores verificaram que, após três anos, a taxa de recorrência nos pacientes que mantiveram uma boa higiene foi baixa. No entanto, algumas cepas persistiram após o tratamento e em outros pacientes houve a recolonização. Além disso, alguns fungos que não haviam sido encontrados anteriormente e menos sensíveis foram encontrados em alguns pacientes.

A terapia tópica geralmente é eficaz no controle da candidose de baixo grau. Em casos de candidose bucal grave, a terapia tópica é aplicada em conjunto com a terapia sistêmica. Em estudo realizado em 2009 por Sholapurkar et al., comparou-se a eficiência de enxaguatórios bucais à base de fluconazol e de clotrimazol. Os pacientes realizavam bochechos com estas soluções, sendo que o grupo do fluconazol bochechava por 2 a 3 min e depois engolia os 5 mL desta solução, mas não houve diferenças significativas entre os dois enxaguatórios, os dois foram eficientes e bem tolerados pelos pacientes (Sholapurkar et al.⁵⁸ 2009).

A instrução de higiene e o uso de enxaguatórios bucais podem ser tratamentos mais conservadores. No entanto, os clínicos devem lembrar que estes enxaguatórios causam efeitos adversos quando usados por longos períodos. A duração deste tratamento não deveria ser superior a duas semanas e o mesmo deveria ser interrompido assim que fosse notada uma melhora clínica e a quantidade de *C. albicans* fosse reduzida (Koray et al.⁶⁰ 2005).

Chandra et al.¹² (2001) desenvolveram um modelo experimental em ratos, do biofilme da *C. albicans* na prótese, e analisaram a susceptibilidade desta levedura a quatro antifúngicos utilizados no tratamento da estomatite protética (anfotericina B, nistatina, clorexidina e fluconazol). A *C. albicans*, desenvolvendo-se como biofilme, apresentou resistência a estes medicamentos, no entanto, quando cresceu na forma planctônica apresentou susceptibilidade a estes agentes.

A anfoterecina B frente às cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética apresentou ótima atividade fungicida, sendo o único fármaco do estudo com esta ação. Entre os azóis, o cetoconazol e o miconazol apresentaram atividade fungistática. Os autores ainda sugerem que novas formulações de fármacos são necessárias para o tratamento da estomatite

protética, assim como a pesquisa com outros fármacos, principalmente para o uso tópico (Batista et al.⁶¹ 1999).

2.3 *CANDIDA spp.*

Nos últimos anos, vários estudos tem isolado outras espécies de *Candida*, além da *C. albicans*, que estão também envolvidas na patogênese da estomatite protética (Coleman et al.¹⁴ 1997; Bagg et al.⁶¹ 2003; Redding et al.⁶² 2004; Li et al.⁶³ 2007). Uma grande variedade de microrganismos tem-se mostrado como causadores de infecção, como *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* (Lyon et al.⁵² 2006; Marcos-Arias et al.⁶⁴ 2009) e *C. guilliermondii* (Marcos-Arias et al.⁶⁴ 2009). A emergência de outras espécies de *Candida* é significativa porque elas são frequentemente resistentes aos antifúngicos de uso comum (Bagg et al.⁶¹ 2003; Redding et al.⁶² 2004; Li et al.⁶³ 2007). Redding et al.⁶⁵ (2003) analisaram a resistência ao fluconazol da *C. glabrata* em pacientes que estavam recebendo radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço e desenvolveram candidose. Os autores observaram que houve resistência ao fluconazol dessa espécie de *Candida* e concluíram que esta resistência é um processo altamente variável que envolve múltiplos processos moleculares.

Coco et al.⁶⁸ (2008) encontraram a *C. albicans* como espécie predominante nas colônias de leveduras bucais (Coco et al.⁶⁶ 2008; Atique,⁶⁷ 2006), tendo sido isolada em 75% dos pacientes estudados, sendo esta porcentagem elevada para 81% nos pacientes com estomatite protética (Coco et al.⁶⁶ 2008). *C. glabrata* foi a segunda espécie mais encontrada (Coco et al.⁶⁶ 2008; Atique,⁶⁷ 2006) (29,73%). Os autores concluíram que o biofilme formado por *C. albicans* e *C. glabrata* pode ser um importante agente na patogênese associada com a inflamação nos usuários de próteses (Coco et al.⁶⁶ 2008).

Em estudo realizado em 2009, Marcos-Arias et al.⁶⁴ (2009) avaliaram a atividade de fosfolipases e proteinases de isolados bucais de *Candida spp.* e sua relação com a presença de estomatite protética. Nos pacientes com infecção, *C. albicans* (66,44%) foi a espécie mais predominante, seguida por *C. tropicalis* (11,84%), *C. glabrata* (9,21%), *C. guilliermondii* (7,23%), *C. parapsilosis* (2,63%), *C. dubliniensis* (um isolado) e *C. Krusei* (um isolado). A produção de proteinase foi observada em menos que 30% das espécies isoladas e não foi relacionada com a

presença de estomatite protética, já a produção de fosfolipase foi exclusiva da *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Sanitá et al.⁶⁸ (2011) verificaram que a *C. albicans* foi isolada de 81,9% de pacientes diabéticos. *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram isoladas de 15,71% e 15,24% dos 210 participantes, respectivamente. *C. albicans* também foi isolada de 64% dos pacientes sem estomatite protética, mas esta porcentagem subiu para 93% e 100% nos grupos de pacientes com estomatite protética. Os autores observaram que espécies diferentes de *C. albicans* foram identificadas tanto nos pacientes saudáveis como nos pacientes com estomatite protética com ou sem diabetes. *C. albicans* e *C. tropicalis* foram mais prevalentes nos pacientes com estomatite protética.

Vários fatores de virulência contribuem para a patogenicidade da *Candida spp.*, incluindo a habilidade de aderir-se a células endoteliais e epiteliais (Sugita et al.⁶⁹ 2002), germinação, secreção extracelular de proteinases de fosfolipases (Ghannoum,⁷⁰ 2000). As características fenotípicas das amostras de *C. albicans* mostram que os isolados desta levedura são fortemente proteolíticos, capazes de produzir fosfolipases (Oliveira et al.⁷¹ 1998). De acordo com Ghannoum e Abu Elteen⁷² (1986), a tendência de a *C. albicans* ser saprófita ou infecciosa depende do equilíbrio entre a patogenicidade da levedura e o organismo do hospedeiro, sendo que vários parâmetros estão envolvidos neste processo.

2.4 TRATAMENTOS ALTERNATIVOS PARA ESTOMATITE PROTÉTICA

O estudo de espécies vegetais, utilizadas pela população em geral, trouxe grandes avanços terapêuticos. Dentre alguns dos compostos isolados de produtos vegetais pode-se citar a morfina, estriçnina e quinina (Hamburger, Hostettman⁷³ 1991; Phillipson⁷⁴ 2001). Sabe-se que para o tratamento da estomatite protética, além do uso de antifúngicos, tópicos ou sistêmicos, faz-se necessário a desinfecção da prótese e da mucosa oral (Salerno et al.³⁶ 2011). Neppelenbroek et al.⁷⁵ (2008) utilizaram o método de desinfecção em micro-ondas de próteses de pacientes com estomatite protética, imersas em água, o que pode eliminar as colônias e os micélios da *Candida*. Esta desinfecção foi eficaz no tratamento da estomatite protética e independente da terapia antifúngica utilizada a re-infestação da superfície da prótese e dos tecidos adjacentes por *Candida sp.* foi drasticamente

reduzida. Quando usado isoladamente o miconazol não foi eficaz no tratamento da estomatite protética. Mima et al.⁷⁶ (2008) realizaram um estudo avaliando o uso de diferentes tempos de exposição ao micro-ondas para desinfecção de uma resina para reembasamento rígido imediato. Eles inocularam *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *C. albicans* e *Bacillus subtilis* nesta resina. Verificaram que após dois minutos de irradiação, os espécimes inoculados com *C. albicans* foram esterilizados, enquanto com as bactérias foram desinfetados. Outra alternativa para a inativação de microrganismos patogênicos da estomatite protética é a terapia fotodinâmica (PDT). Estudos mostram que a PDT pode apresentar um efeito letal em *C. albicans* (Donnelly et al.⁷⁷ 2008; Prates et al.⁷⁸ 2009). Sabendo-se da resistência do gênero *Candida* após exposição prolongada ou repetida a antifúngicos, estas estratégias de tratamentos devem ser propostas baseadas no fato de que a terapêutica da candidose pode ser orientada por testes *in vitro* (Pappas et al.⁵³ 2004).

Carretto et al.⁷⁹ (2007) avaliaram o efeito *in vitro* do chá de tomilho (*Thymus vulgaris* Linn.) sobre a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário e de *Candida albicans* às superfícies de resina acrílica. Os autores verificaram que o chá de tomilho inibiu a aderência de *C. albicans* à resina acrílica, mas não apresentou efeito sobre a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário.

Dentre as espécies estudadas tem-se a malva (Figura 1a), planta da família *Malvaceae*, que é muito usada pela medicina popular principalmente na América Latina, inclusive no Brasil, por apresentar propriedades anti-sépticas e antiinflamatórias, sendo também empregada nas formulações de enxaguatórios bucais e cremes dentais (de Souza et al.²² 2004).

Magro et al.⁸⁰ (2006) testaram a atividade fungistática de seis extratos alcoólicos de plantas medicinais dentre elas a malva, e concluíram que o extrato desta planta inibiu completamente o crescimento fúngico e mostrou o melhor resultado. Alves et al.²⁰ (2009) obtiveram resultados que mostram a importância das indicações terapêuticas das plantas medicinais como método alternativo e de baixo custo, à nível de produção, na clínica odontológica, uma vez que os extratos hidroalcoólicos da aroeira-do-sertão, goiabeira e malva apresentaram atividade antifúngica *in vitro* sobre cepas de *Candida* isoladas da cavidade bucal.

A própolis (Figura 1b) é uma resina elaborada pelas abelhas a partir da coleta de substâncias secretadas pelas plantas. Esta substância é amplamente

utilizada no preparo de cremes, loções e pomadas. Já é comprovado que a própolis apresenta muitas propriedades terapêuticas tais como: antiinflamatória, imunoestimulatória, cicatrizante, antisséptica (Park et al.⁸¹ 2002), antibacteriana e antifúngica (Kujumgiev et al.⁸² 1999). Sua composição está intimamente relacionada com a ecologia da região onde é coletada (Park et al.⁸¹ 2002; Kujumgiev et al.⁸² 1999).

Molina et al.⁸³ (2008) testaram a ação antifúngica do extrato de própolis, mamona, sálvia e calêndula contra 20 cepas de *C. albicans*. Os resultados encontrados por eles demonstraram que o extrato glicólico de própolis foi o mais efetivo apresentando atividade antifúngica para todas as cepas de *C. albicans* avaliadas, seguido pelo extrato glicólico de sálvia, que apresentou atividade antifúngica para 80% das cepas. O extrato glicólico de calêndula apresentou baixa atividade sobre *C. albicans* e o extrato comercial de mamona não apresentou ação antifúngica. Ota et al.⁸⁴ (2001) avaliaram o efeito *in vitro* do extrato alcoólico de própolis sobre 80 espécies de leveduras do gênero *Candida* e observaram que todas as cepas foram sensíveis a esse extrato e, no estudo *in vivo*, todos os pacientes do grupo experimental que utilizavam próteses totais e usaram o extrato hidroalcoólico de própolis como enxaguatório bucal mostraram uma diminuição do número de leveduras do gênero *Candida*. Silici et al.⁸⁵ (2005) verificaram que baixas concentrações de própolis foram efetivas contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *Trichosporon sp.*, e *Rhodotorula sp.*

O extrato de *Azadirachta indica* (Figura 1c) é um poderoso agente inibidor frente a microrganismos infecciosos que causam doenças na cavidade bucal. Na Índia e na África, os dentistas tem aprovado esta prática por acreditarem que o extrato de neem realmente previne o aparecimento de doenças periodontais (Verma et al.²⁴ 2009). Contudo, o extrato de neem aquoso não parece ter um efeito fungicida contra as espécies de *Candida* devido às baixas concentrações dos compostos bioativos, mas esse efeito pode aumentar se agregado ao álcool (Casaroto, Lara⁹ 2010). *A. indica* pode ser usada no desenvolvimento de potenciais agentes de controle contra uma série de fungos e bactérias patogênicas e na produção de novos compostos naturais antimicrobianos (Verma et al.²⁴ 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem aparecido para confirmar a ação fungistática e fungicida do extrato do neem contra *Aspergillus sp.* e *Candida sp* (Fabry et al.⁸⁶ 1996; SaiRam et al.⁸⁷ 2000), além da redução de adesão deste

microrganismo à base de resina acrílica das próteses totais (Polaquini et al.⁸⁸ 2006). A multivariabilidade biológica e farmacológica atribuída a diferentes partes e extratos do neem, justifica a grande referência a esta planta como “maravilhosa planta” (Atawodi, Atawodi⁸⁹ 2009).



Figura 1 – a – *Malva Sylvestris*; b – Própolis bruta; c - *Azadirachta indica* (neem).

Fonte: www.gettingimage.com

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica de extratos naturais de duas plantas medicinais e de própolis, em diferentes concentrações, sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

3.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

- Avaliar o efeito do extrato de *Malva Sylvestris*, e *Azadirachta indica* nas concentrações de 1:1, 1:2 e 1:4 e do extrato de própolis, 20% e 30%, na inibição do crescimento de diferentes espécies de *Candida* pelo método de difusão em meio sólido (discos de papel) e em diluições seriadas (microdiluição) para determinação da concentração inibitória mínima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DOS PRODUTOS NATURAIS

As folhas secas de malva utilizadas no estudo foram adquiridas na loja de produtos naturais Da Terra Produtos Naturais, em Ponta Grossa-Paraná. Já o neem foi adquirido através do site www.neembrasil.com.br, sendo a empresa fornecedora o Projeto Neem Brasil, situada na Fazenda Fortaleza, no município de Silvânia-Goiás. Foram utilizadas folhas secas de ambas as plantas. Já a própolis é comercializada pronta na própria farmácia de manipulação (Íons Farma) já na concentração de 30%.

Todos os extratos hidroalcoólicos dos produtos naturais foram manipulados na farmácia de manipulação Íons Farma, na cidade de Ponta Grossa – PR, nas concentrações de 1:1 (1 mL de extrato para 1 mL de solvente (álcool de cereais), 1:2 (1 mL de extrato para 2 mL de solvente) e 1:4 (1 mL de extrato para 4 mL de solvente), para os extratos de malva e neem. Já o extrato de própolis foi utilizado na concentração de 20 e 30% (Quadro 1).

Quadro 1 - Produtos naturais utilizados para obtenção dos extratos hidroalcoólicos

Produtos naturais	Nome científico	Concentração dos extratos (% e mL por mL)
Própolis	Própolis	20 e 30%
Malva	<i>Malva sylvestris</i>	1:1, 1:2 e 1:4
Neem	<i>Azadirachta indica</i>	1:1, 1:2 e 1:4

Fonte: o autor

Para preparação destes extratos na concentração de 1:1 utilizou-se uma parte da folha da planta finamente triturada com uma parte de álcool de cereais (líquido extrator). Esta mistura foi armazenada em recipiente de vidro escuro e deixada em maceração por 7 dias, em ambiente sem luz, com agitação diária no vidro. Após 7 dias, é retirada a parte líquida e filtrada em algodão e acondicionado novamente em vidro escuro. Para diluir os extratos é utilizada uma parte do extrato na concentração de 1:1 e a mesma quantidade de álcool de cereais, e assim sucessivamente.

O extrato de própolis é comercializado já na concentração de 30% e para sua diluição utiliza-se a mesma técnica dos extratos das plantas.

4.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Foram utilizados os meios de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Himedia, HIMEDIA, Vadhani Industrial Estate, Marg LBS, Mumbai, Índia), CHOMagar Candida (Dickinson and Company Becton, Loveton Circle Sparks, Maryland, EUA) e Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (Himedia, HIMEDIA, Vadhani Industrial Estate, Marg LBS, Mumbai, Índia), todos preparados de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.3 OBTENÇÃO DAS COLÔNIAS DE *CANDIDA* spp.

As cepas de *Candida* spp. utilizadas neste estudo foram isoladas da cavidade oral de pacientes com estomatite protética (Pacientes pertenciam ao projeto de pesquisa intitulado: “Estudo clínico do uso tópico da *Uncaria tomentosa* em pacientes usuários de prótese total, portadores de candidose bucal”, da doutoranda Lidia Yileng Tay Chu Jon, com COEP: 17572/10), utilizando-se o meio de cultura CHROMagar Candida (Dickinson and Company Becton, Loveton Circle Sparks, Maryland, EUA), (Figura 2) que diferencia as espécies de *Candida* pela cor das colônias que crescem na placa. As espécies obtidas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. A escolha destas espécies se deve à sua prevalência nos casos de estomatite protética, sendo *C. albicans* a mais prevalente, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Optou-se por usar cepas isoladas de pacientes para tentar aproximar-se mais das condições reais da infecção destas leveduras, principais patógenos da doença (estomatite protética).

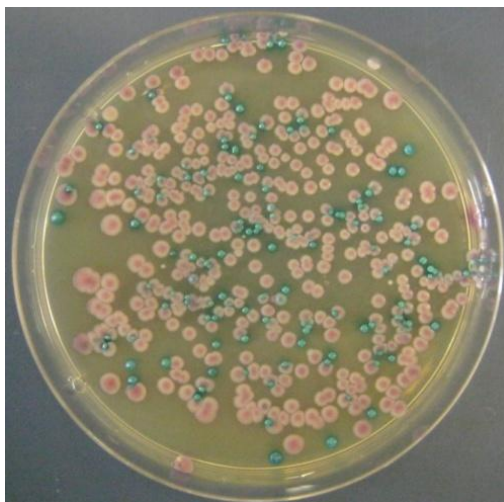


Figura 2 – Exemplo das espécies de *Candida* diferenciadas em CHROMagar.

No período do teste foi realizada uma subcultura (repique) dos organismos para novo meio de ASD (Himedia, HIMEDIA, Vadhani Industrial Estate, Marg LBS, Mumbai, Índia) até alcançarem o período ideal para a realização dos testes (48 h), ou seja, para se obter estruturas jovens e em fase de crescimento consistindo de micélios e conídeos. As espécies de *Candida* foram semeadas com uma alça de Drigalski no ASD e foram mantidas em estufa bacteriológica por 48 h. Para verificar a efetividade dos extratos naturais foram utilizados dois métodos microbiológicos: 1- método de difusão em meio sólido (com discos de papel) e 2- ensaio da concentração inibitória mínima (CIM).

4.4 MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO (DISCOS DE PAPEL)

Ao meio de cultura ASD (Himedia, HIMEDIA, Vadhani Industrial Estate, Marg LBS, Mumbai, Índia) foi adicionado cloranfenicol 500 mg (DUCTO, Anápolis, Goiás, Brasil). Este meio de cultura apresenta-se sólido após o preparo e é seletivo para a cultura de fungos. Após o seu preparo seguindo as recomendações dos fabricantes, o meio de cultura recebeu a incorporação de cloranfenicol 500 mg (DUCTO, Anápolis, Goiás, Brasil), e foi esterilizado em autoclave por 15 min a uma temperatura de 120°C e 1 atm. Em seguida foram vertidos nas placas de Petri, já estéreis, 25 ml de meio, sendo que estas foram encubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Isto foi realizado com o intuito de verificar a esterilização das placas de Petri e dos meios de cultura. Todos os testes descritos foram feitos em duplicata para cada grupo experimental. Cada extrato foi testado nas três concentrações para

cada espécie de *Candida*, sendo também realizado um grupo controle positivo (Nistatina suspensão oral 100.000 UI/mL – Cristalia, Nova Itapira, São Paulo, Brasil).

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel estéreis (6 mm de diâmetro). Vinte microlitros dos extratos foram utilizados, por disco, que foram impregnados com os extratos e com o controle com o auxílio de uma micropipeta (Labmet, Labmais Comércio de Equipamentos Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil). Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica. Em seguida os discos de papel estéreis já impregnados com os tratamentos foram deixados para secar durante 20 min, aproximadamente, para remover qualquer solvente residual (Figura 3).

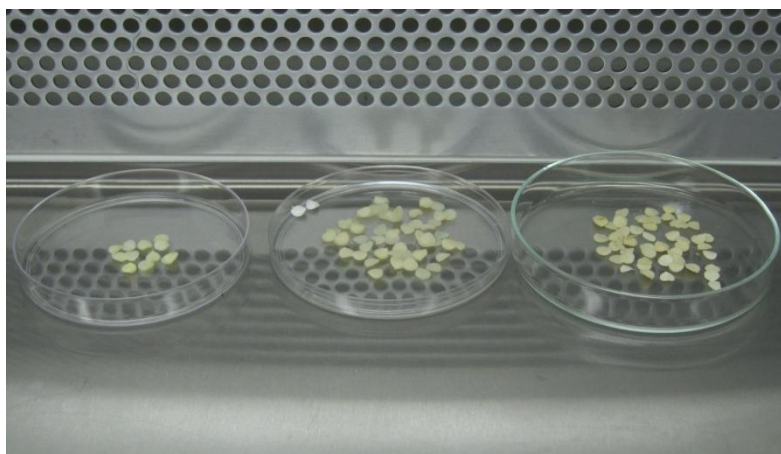


Figura 3 – Discos de papel estéreis impregnados com os extratos (própolis 20 e 30%) e com o controle positivo (Nistatina suspensão oral).

Um inóculo de microrganismos foi preparado em uma solução salina estéril (NaCl 0,85%). A turvação deste inóculo foi ajustada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 580 nm, de acordo com a escala de turbidez 0,5 de McFarland, o que corresponde a $1-3 \times 10^4$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL) para fungos (Figura 4 e 5).



Figura 4 – Espectrofotômetro calibrado em 580 nm para ajustar a turvação do inóculo.

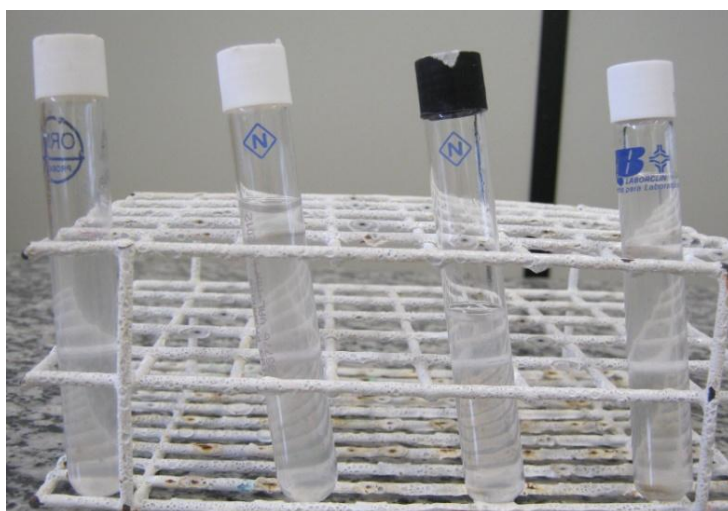


Figura 5 – Inóculo preparado na concentração de $1-3 \times 10^4$ UFC/ml.

Os fungos foram inoculados nas placas com o auxílio de um Swab estéril (Oralplast, Ucrol, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os testes foram realizados em duplicata e, após a inoculação do fungo, em cada placa foram colocados um disco com cada concentração do extrato e um disco impregnado com o controle, como mostra a Figura 6.

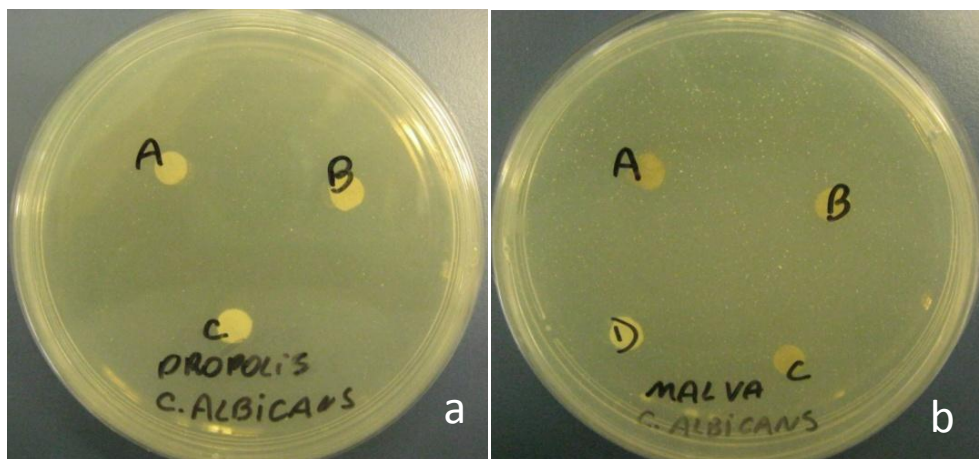


Figura 6 – Disposição dos discos nas placas, sendo em a – Disco A impregnado com extrato de própolis a 20%, disco B extrato na concentração 30%, C disco impregnado com o controle; em b – Disco A impregnado com extrato de malva ou neem 1:1, B extrato na concentração de 1:2, C extrato na concentração 1:4 e em D controle (nistatina).

As placas foram mantidas em estufa a temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ até o desenvolvimento das colônias (48 h). A atividade antifúngica foi avaliada após este período para o disco controle e nos diferentes tratamentos.

Após o período de incubação foi realizada a leitura visual (pelo mesmo operador, o qual não sabia quais as concentrações dos extratos no momento da leitura) observando-se o halo de inibição de crescimento quantificado em mm com o auxílio de um paquímetro digital. Os resultados foram expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos em todas as repetições. Halos iguais ou superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antimicrobiana (Ali et al.⁹⁰ 2001; Bakshu et al.⁹¹ 2001; Silva et al.⁹² 2007).

4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes do inóculo, amostra e meio de cultura CSD para 200 μL . As duas primeiras colunas da microplaca foram utilizadas para os controles, que foram: 200 μL de caldo sabouraud dextrose (controle do meio de cultura); 190 μL de meio de cultura e 10 μL de solvente (álcool de cereais) (controle do solvente); 200 μL de meio de cultura inoculado com o microrganismo teste (controle de crescimento - negativo); 10 μL de nistatina e 190 μL de meio de cultura inoculado com o

microrganismo em estudo (controle positivo ou de atividade antimicrobiana). As colunas restantes foram destinadas ao ensaio propriamente dito, sendo colocados 10 µL do extrato e 190 µL do meio, como descrito na Figura 7.

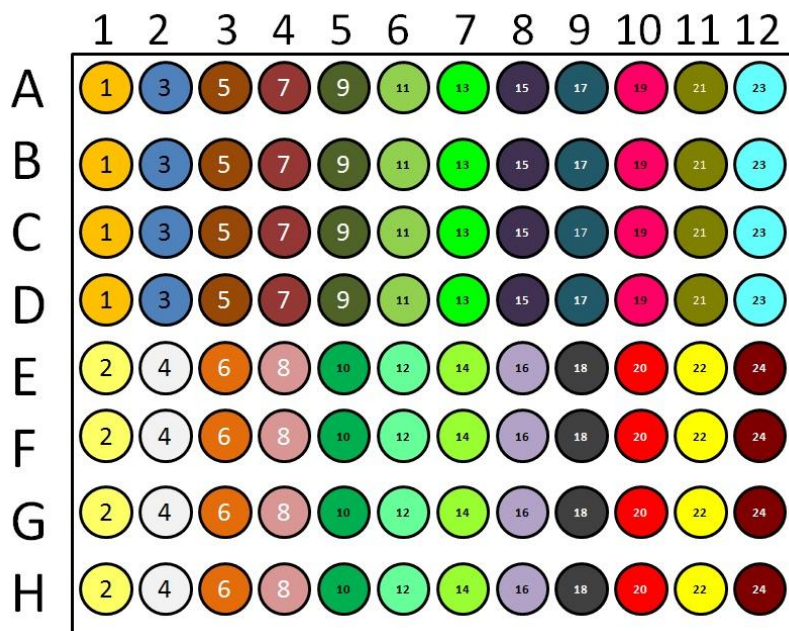
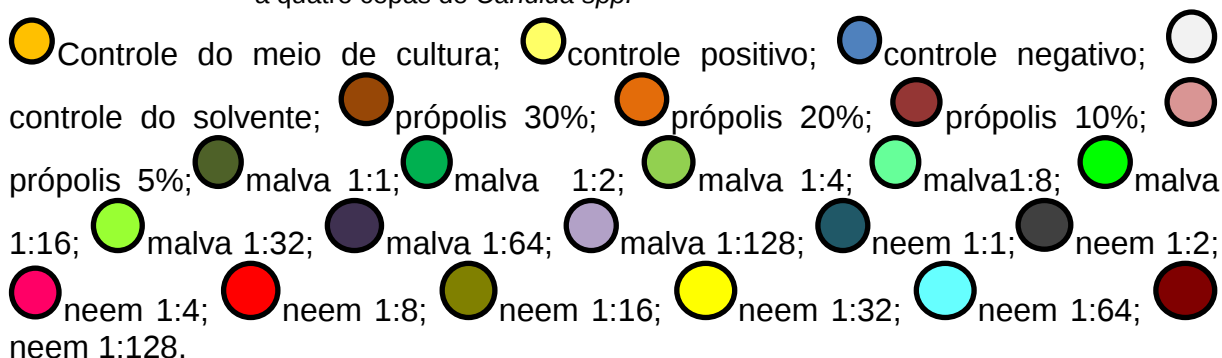


Figura 7 – Distribuição da microplaca utilizada para determinação da CIM dos extratos dos diferentes produtos frente à quatro cepas de *Candida spp.*



Foi realizada uma leitura logo após a colocação dos extratos no meio, para cada poço servir como controle de si mesmo, devido às diferentes turbidezes dos extratos e do controle positivo. Em seguida as placas foram encubadas em estufa bacteriológica e após o período de 48 h, foi realizada uma segunda leitura a 630 nm utilizando-se o leitor de microplacas (FLx800 Fluorescence Microplate Reader, Biotek, Shanghai, Zhangheng Pudong New District, China).

As diluições seriadas dos extratos foram realizadas de 1:1 até 1:128, ou seja, 100% a 0,7%. A 1 mL do extrato na concentração 1:1 foi adicionado 1 mL de álcool de cereais (solvente) para obter-se a concentração de 1:2. A 1 mL do

extrato na concentração de 1:2 foi adicionado 1 mL do solvente, para obter-se a concentração de 1:4. Esse processo foi feito sucessivamente até obter-se a concentração de 1:128, como mostrado na Figura 8.

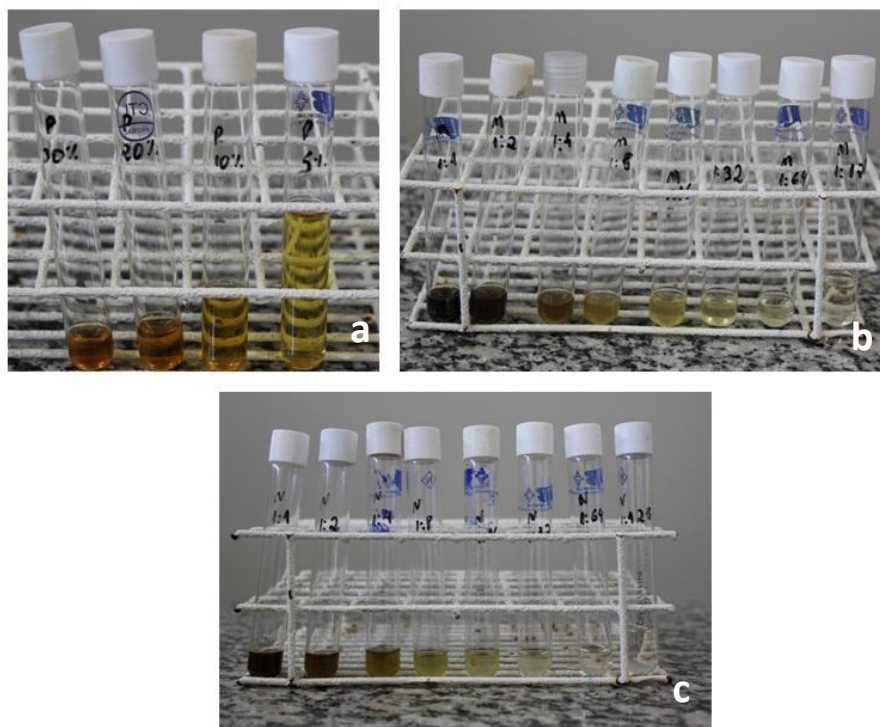


Figura 8 – a – diluição do extrato de própolis; b – diluição do extrato de malva; c – diluição do extrato de neem.

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A susceptibilidade das quatro espécies de *Candida* aos três produtos naturais testados, pelo teste de difusão em meio sólido, foi avaliada por meio da exposição das suspensões celulares a três concentrações de cada produto. Assim, foram avaliadas 27 condições experimentais. Adicionalmente, foi realizado para cada microrganismo um grupo controle positivo (nistatina). Cada condição experimental foi feita em duplicata.

Os valores coletados foram analisados através de estatística descritiva (teste de normalidade), análise de variância com um critério de classificação (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças significativas entre as três concentrações dos extratos das plantas analisadas. Os níveis de significância aplicados foram de 5%. Para cada espécie de *Candida* estudada e para cada produto natural estudado.

Já para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), para cada microrganismo em teste foram realizadas no mínimo duas réplicas com quatro repetições consecutivas e os resultados foram analisados estatisticamente através de estatística descritiva, pois o intuito era apenas de verificar se o extrato inibiu ou não o crescimento fúngico e não comparar entre eles qual foi mais efetivo. Foram comparados os valores obtidos na primeira e na segunda leitura, com a finalidade de verificar se houve ou não crescimento de leveduras.

5 RESULTADOS

5.1 MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO (DISCO DE PAPEL)

Não foi verificado halo de inibição do crescimento de nenhuma das espécies de *Candida*, para os extratos dos produtos testados em nenhuma das concentrações propostas. Os resultados estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3 e nas Figuras 9, 10 e 11.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana (mm) do extrato de Própolis 20 e 30%, diante das diferentes cepas de *Candida*.

Cepas		Extrato dos produtos naturais e controle		
Tempo	Própolis 20%	Própolis 30%	Controle (Nistatina)	
<i>C. albicans</i>	*	*	10,63	
<i>C. glabrata</i>	*	*	11,45	
<i>C. krusei</i>	*	*	8,67	
<i>C. tropicalis</i>	*	*	10,63	

* Não houve inibição do crescimento da levedura

Fonte: o autor

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana do extrato de Malva nas concentrações de 1:1, 1:2 e 1:4 diante das diferentes cepas de *Candida*.

Cepas		Extrato dos produtos naturais e controle			
Tempo	Malva 1:1	Malva 1:2	Malva 1:4	Controle (Nistatina)	
<i>C. albicans</i>	*	*	*	11,15	
<i>C. glabrata</i>	*	*	*	10,49	
<i>C. krusei</i>	*	*	*	8,53	
<i>C. tropicalis</i>	*	*	*	10,88	

*Não houve inibição do crescimento da levedura

Fonte: o autor

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do extrato de Neem nas concentrações de 1:1, 1:2 e 1:4 diante das diferentes cepas de *Candida*.

Cepas		Extrato dos produtos naturais e controle			
Tempo	Neem 1:1	Neem 1:2	Neem 1:4	Controle (Nistatina)	
<i>C. albicans</i>	*	*	*	10,91	
<i>C. glabrata</i>	*	*	*	10,17	
<i>C. krusei</i>	*	*	*	8,68	
<i>C. tropicalis</i>	*	*	*	10,95	

*Não houve inibição do crescimento da levedura

Fonte: o autor

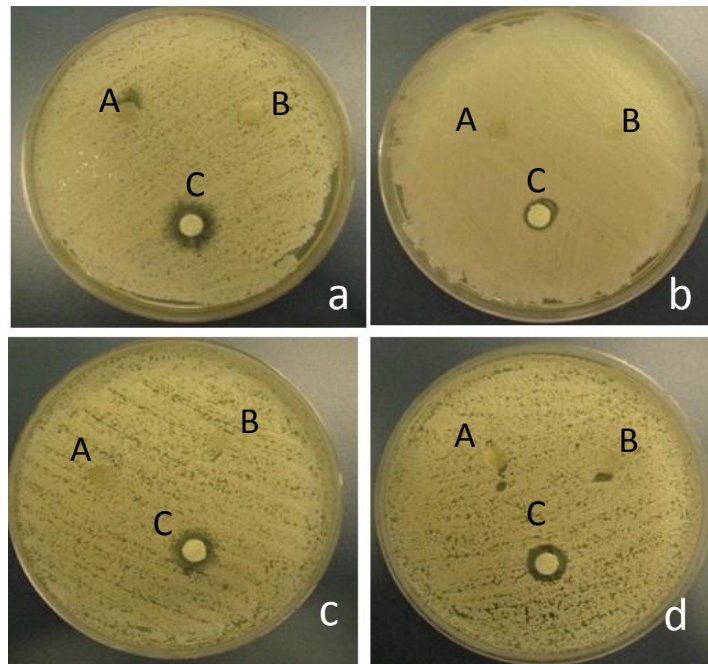


Figura 9 – A – Discos impregnados com extrato de própolis 20%; B – discos impregnados com extratos de própolis 30%; C – controle positivo (Nistatina). a – *C. glabrata*; b – *C. krusei*; c – *C. albicans*; d – *C. tropicalis*.

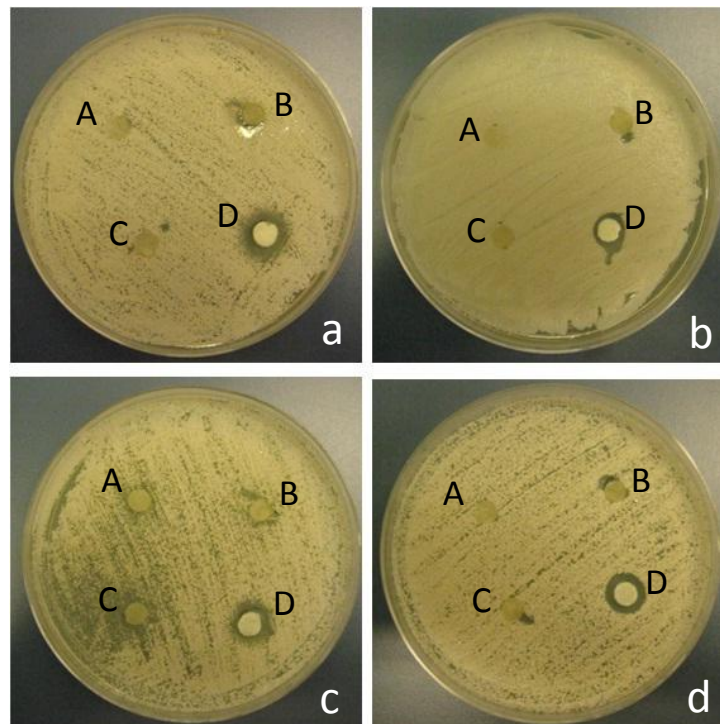


Figura 10 – A – Discos impregnados com extrato de malva 1:1; B – discos impregnados com extrato de malva 1:2; C – discos impregnados com extrato de malva 1:4; D – controle (nistatina). a – *C. glabrata*; b – *C. krusei*; c – *C. albicans*; d – *C. tropicalis*.

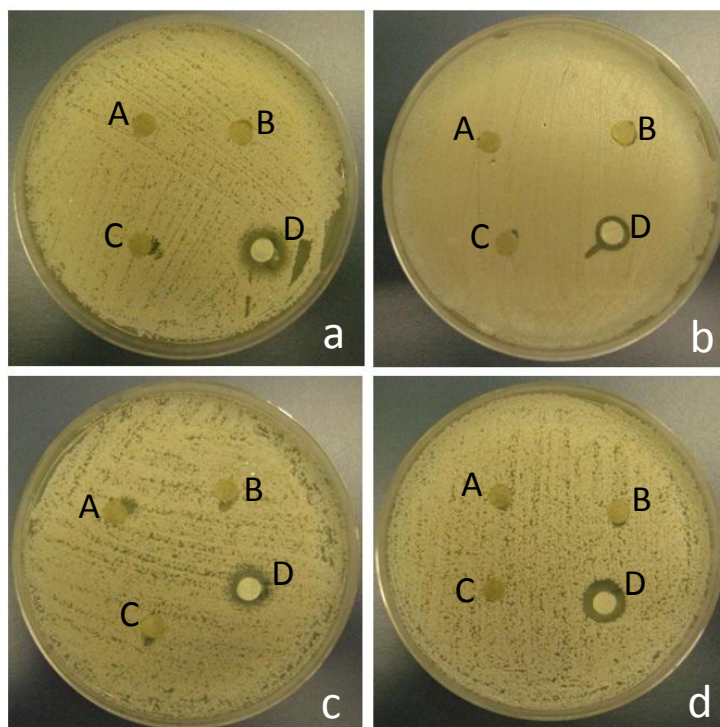


Figura 11 – A – Discos impregnados com extrato de neem 1:1; B – discos impregnados com extrato de neem 1:2; C – discos impregnados com extrato de neem 1:4; D – controle (nistatina). a – *C. glabrata*; b – *C. krusei*; c – *C. albicans*; d – *C. tropicalis*.

Observou-se que a espécie *C. krusei*, não apresentou halo de inibição maior que 10 mm diante do antifúngico nistatina. Devido à possível resistência desta espécie a este medicamento foi realizado mais um teste de difusão em meio sólido (disco de papel) frente à nistatina e frente ao Daktarin gel oral® (Janssen- Cilag Farmacêutica Ltda, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) (miconazol). Os halos apresentados estão exibidos na Figura 12, e o Gráfico 1 mostra as diferenças estatísticas entre as médias do controle (nistatina) frente às diferentes espécies de *Candida*.



Figura 12 – Halos de inibição do crescimento formados com o miconazol e nistatina. A e C – Miconazol; B e D – Nistatina.

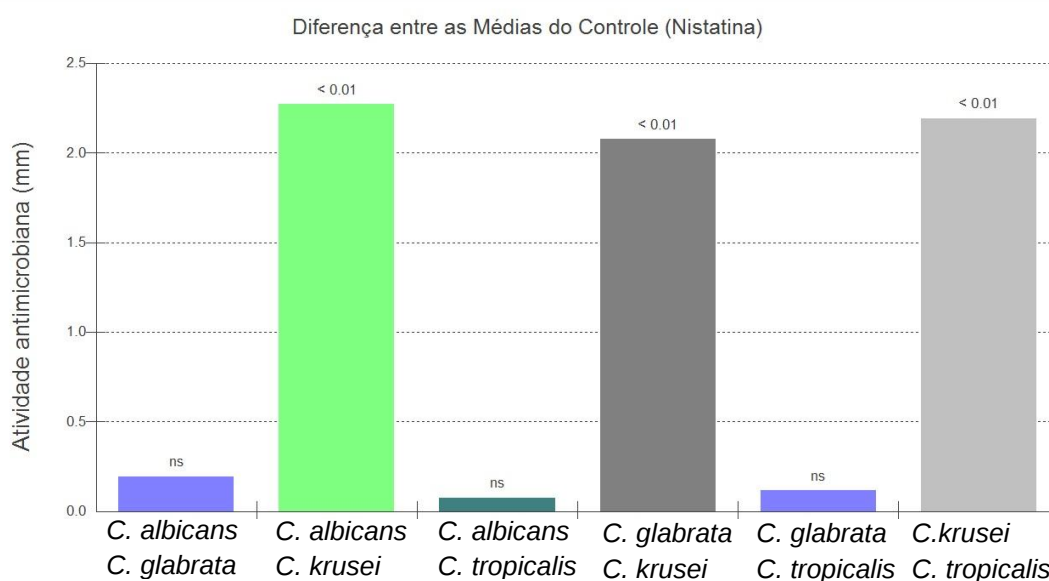


Gráfico 1 – Diferença estatística entre as médias do controle (nistatina) em relação às diferentes espécies de *Candida*. Em 1 – diferença entre *C. albicans* e *C. glabrata* não significativa. Em 2 – diferença entre *C. albicans* e *C. krusei* ($p < 0,01$) significativa. Em 3 – diferença entre *C. albicans* e *C. tropicalis* não significativa. Em 4 – diferença entre *C. glabrata* e *C. krusei* ($p < 0,01$) significativa. Em 5 – diferença entre *C. glabrata* e *C. tropicalis* não significativa. Em 6 – diferença entre *C. krusei* e *C. tropicalis* ($p < 0,01$) significativa.

5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para o cálculo da concentração inibitória mínima foi aplicado o método de microdiluição de acordo com o item 4.5. A utilização deste método requer uma pequena quantidade de amostra (extrato) e permite utilizar mais réplicas, tornando o método mais específico e diminuindo-se o custo (Eloff, ⁹⁴ 1998).

O resultado da CIM foi expresso em porcentagem de inibição em relação ao controle (nistatina) e está expresso nas Tabela 4, 5 e 6 e nos Gráficos 2, 3 e 4. Sendo que o controle foi considerado como 100% de inibição e o cálculo da inibição dos extratos foi realizado da seguinte maneira:

1 – A média de cada tratamento foi obtida para cada leitura.

2 – Foi feita uma diferença entre a média da absorbância da primeira leitura e da segunda leitura.

Ex: Própolis 30% (*C. albicans*): $1,914 - 2,114 = - 0,200$, ou seja, a absorbância aumentou 0,200.

3 – Neste caso a diferença entre as duas leituras da absorbância do controle negativo foi de 0,809. A média dos poços com o controle positivo foi de 0,015, ou seja, o controle positivo inibiu 0,794 ($0,809 - 0,015$).

4 – O valor do controle positivo foi considerado como inibição de 100%. Uma regra de três foi aplicada para determinar a porcentagem de inibição que cada extrato apresentou.

O solvente não apresentou inibição de crescimento diante das diferentes cepas e no meio de cultura sem o fungo inoculado não houve crescimento de leveduras.

Tabela 4 – Porcentagem (%) de inibição do extrato de própolis em comparação com o controle (nistatina) frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Extratos utilizados	Espécies de <i>Candida</i> testadas			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
Controle (nistatina)	100	100	100	100
Própolis 30%	51,51	60,22	52,95	60,13
Própolis 20%	36,27	44,33	38,45	56,79
Própolis 10%	25,18	28,03	31,26	46,10
Própolis 5%	12,72	22,79	21,26	31,73

Fonte: o autor

Tabela 5 – Porcentagem (%) de inibição do extrato de malva em comparação com o controle (nistatina) frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Espécies de <i>Candida</i> testadas				
Extratos utilizados	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
Controle (nistatina)	100	100	100	100
Malva 1:1 (100%)	37,65	35,35	34,36	33,18
Malva 1:2 (50%)	36,78	37,15	41,69	22,49
Malva 1:4 (25%)	10,45	15,88	33,52	22,16
Malva 1:8 (12,5%)	9,06	11,46	26,47	11,91
Malva 1:16 (6,25%)	5,79	7,18	7,04	10,00
Malva 1:32 (3,12%)	1,76	16,85	11,97	13,69
Malva 1:64 (1,56%)	3,52	6,90	7,04	1,00
Malva 1:128 (0,78%)	1,38	1,51	0,42	3,89

Fonte: o autor

Tabela 6 – Porcentagem (%) de inibição do extrato de neem em comparação com o controle (nistatina) frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Espécies de <i>Candida</i> testadas				
Extratos utilizados	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
Controle (nistatina)	100	100	100	100
Neem 1:1 (100%)	45,59	64,64	53,80	51,44
Neem 1:2 (50%)	34,00	47,51	50,70	58,35
Neem 1:4 (25%)	25,94	34,11	23,23	41,31
Neem 1:8 (12,5%)	20,27	16,02	6,33	29,17
Neem 1:16 (6,25%)	19,77	23,89	0,42	18,15
Neem 1:32 (3,12%)	14,23	18,64	2,11	9,79
Neem 1:64 (1,56%)	10,83	13,95	0,14	6,90
Neem 1:128 (0,78%)	8,56	12,01	0,00	6,34

Fonte: o autor

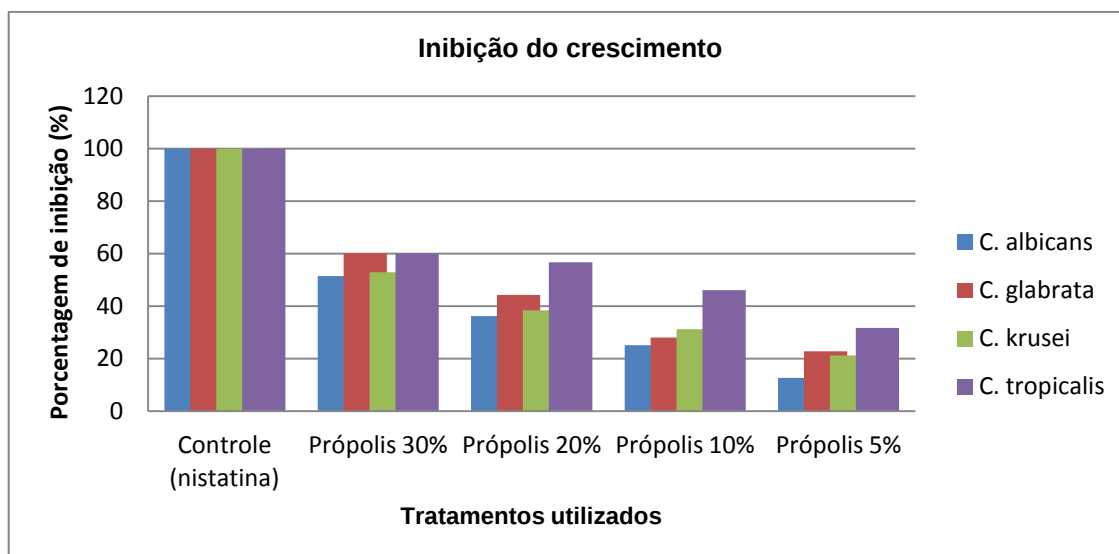


Gráfico 2 – Porcentagem de inibição do extrato de própolis frente às diferentes espécies de *Candida*.

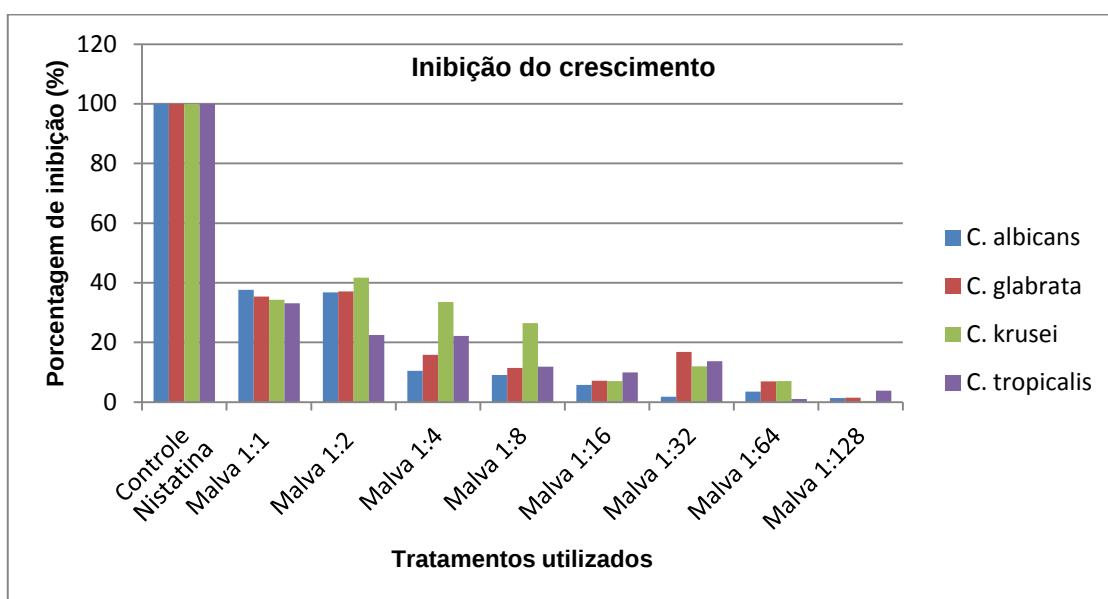


Gráfico 3 – Porcentagem de inibição do extrato de malva frente às diferentes espécies de *Candida*.

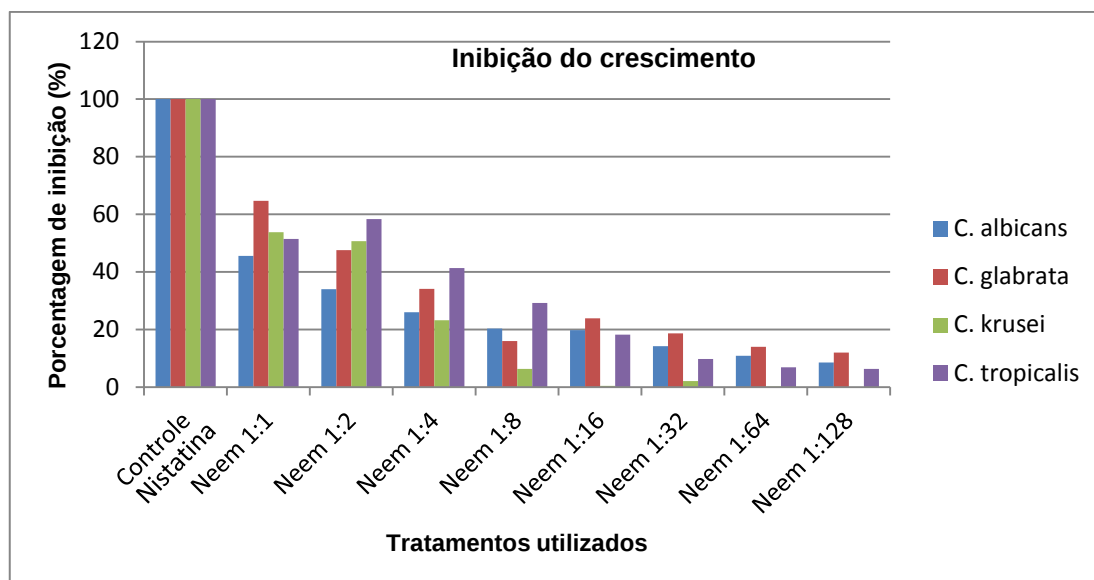


Gráfico 4 – Porcentagem de inibição do extrato de neem frente às diferentes espécies de *Candida*.

A CIM foi definida como a menor concentração do composto que produziu uma redução de pelo menos 50% do crescimento fúngico quando comparado com o controle positivo (Pinto⁹⁴ 2010). Estes resultados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima dos produtos naturais.

Cepas	Produtos naturais utilizados		
	Própolis	Malva	Neem
<i>C. albicans</i>	30%	*	*
<i>C. glabrata</i>	30%	*	1:1
<i>C. krusei</i>	30%	*	1:1
<i>C. tropicalis</i>	20%	*	1:2

* Não houve inibição acima de 50% em relação ao controle.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou a atividade antifúngica de três produtos naturais frente a diferentes cepas de *Candida*. Os produtos utilizados foram a própolis, a malva e o neem. A própolis foi escolhida porque muitos autores relatam sua ação antifúngica, principalmente frente à *C. albicans*, principal patógeno da estomatite protética (Kujumgiev et al.⁸² 1999; Sawaya et al.⁹⁵ 2002; Sonmez et al.⁹⁶ 2005; Silici et al.⁸⁵ 2005; Salomão et al.⁹⁷ 2008). O mesmo ocorreu com o neem, no entanto, os estudos dessa planta são em menor número que a própolis (Polaquini et al.⁸⁸ 2006). Já a malva foi escolhida por ter sido uma das plantas mais citadas como tratamento alternativo para as afecções odontológicas (Oliveira et al.⁹⁸ 2007).

Atualmente o uso de fitoterápicos tem se intensificado, principalmente no Brasil, que possui uma grande biodiversidade. Essa informação tem relevância, visto que, grande parte dos principais microrganismos relacionados com a estomatite protética tem apresentado resistência aos antifúngicos mais utilizados para o tratamento desta doença. Isso se deve principalmente ao uso indiscriminado e prolongado dos fármacos industrializados (Crisan et al.⁹⁹ 1995).

Os resultados do teste de difusão em meio sólido (disco de papel) mostraram que a espécie de *C. krusei* apresentou um halo de inibição inferior ao ideal (10 mm) frente ao antifúngico Nistatina Suspensão Oral. Este medicamento é comumente utilizado para o tratamento da estomatite protética. Isso sugere o que muitos estudos tem indicado, pois alguns antifúngicos convencionalmente utilizados tem apresentam uso limitado, principalmente devido a fatores como baixa potência, baixa solubilidade, toxicidade e o aparecimento de cepas resistentes (Duarte et al.¹⁸ 2005). Das cepas isoladas neste estudo, a *C. krusei* não foi a mais encontrada, no entanto, pode estar relacionada com a recidiva de pacientes que sejam tratados com este antifúngico. Após realização de um novo teste de difusão em meio sólido (disco de papel) utilizando nistatina suspensão oral e Daktarin gel® (miconazol), esta espécie apresentou maior susceptibilidade ao Daktarin gel® (miconazol) do que à nistatina suspensão oral, por isso mais estudos são necessários, para avaliar a sensibilidade destes microrganismos frente aos antifúngicos convencionais. Atique⁶⁷ (2006) verificou que as espécies de *Candida* “não-albicans” são mais resistentes aos antifúngicos azóis e à anfotericina B que os isolados de *C. albicans* (Atique⁶⁷ 2006). A *C. krusei* tem se apresentado como um patógeno ocasional, principalmente em

pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e ou submetidos a transplante de medula óssea. Tem sido relatado o aumento de fungemias causadas por esta levedura em pacientes neutropênicos que foram expostos prolongadamente ao fluconazol. Esta levedura é naturalmente resistente ao fluconazol e talvez isso explique o aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico (Nucci, Colombo¹⁰⁰ 2002). A resistência ocorre por um processo de seleção natural. Cepas mais resistentes tem surgido cada vez mais. Dentre as espécies de *Candida* mais susceptíveis estão a *C. albicans*, e entre as menos susceptíveis estão a *C. glabrata* e *C. krusei*. Os fracassos nos tratamentos estão levando os cientistas a pesquisarem drogas de espectro maior, que por sua vez causam maiores efeitos colaterais para os pacientes (Castro et al.³⁸ 2006). Por isso a grande importância de se encontrar produtos naturais que possam ser usados no tratamento destas enfermidades.

No presente estudo foi verificado que a própolis não apresentou ação antifúngica contra nenhuma espécie de *Candida* avaliada, quando realizado o teste de difusão em meio sólido (disco de papel). Como a própolis pode apresentar diferentes composições dependendo da região em que é encontrada, alguns extratos podem ou não ser efetivos. Kujumgiev et al.⁸² (1999), realizaram um estudo para avaliar a atividade antifúngica de extratos alcoólicos de própolis de diferentes regiões geográficas. Eles também utilizaram o teste de difusão em meio sólido (poços) com a própolis em várias concentrações, dentre elas 20% e 30%. Concluíram que além da própolis poder apresentar diferentes composições dependendo da região em que é encontrada, encontraram atividade antifúngica deste composto.

Neste estudo utilizamos o extrato hidroalcoólico de própolis, Molina et al.⁸³ (2008) avaliaram a eficácia do extrato glicólico de própolis e outras plantas diante de cepas de *Candida albicans*. Estes encontraram que a própolis foi o extrato mais efetivo. O que se pode observar é que o extrato usado era glicólico e não alcoólico, isso pode ter gerado a diferença entre os resultados obtidos por Molina et al.⁸³ (2008) e este estudo. A maioria dos estudos com o extrato de própolis é testando este produto contra bactérias patógenas orais, no entanto, mais estudos deste composto devem ser realizados para verificar se ele realmente pode ser utilizado contra leveduras, principalmente do gênero *Candida*.

Quando realizado o ensaio para determinação da concentração inibitória mínima, o extrato de própolis apresentou os melhores resultados na

concentração de 30%, o qual inibiu mais de 50% do crescimento para todas as espécies de *Candida*. O líquido extrator utilizado não apresentou inibição do crescimento da levedura. Este resultado está de acordo com Longhinie et al.¹⁰¹(2005), os quais também testaram o extrato de própolis alcóolico em várias concentrações e obtiveram bons resultados até mesmo em concentrações muito pequenas. Já o extrato glicólico deste produto natural não apresentou a mesma efetividade. Santos et al.¹⁰² (2005) verificaram que os pacientes que foram tratados com extrato de própolis na concentração de 20% apresentaram redução nas lesões de candidíase associada com a estomatite protética muito semelhante aos pacientes tratados com a nistatina.

Nas placas com o extrato de malva não se observou a formação de nenhum halo de inibição. Matos et al.¹⁰³ (2009) constataram que a malva não possui atividade antifúngica, em concordância com nosso estudo, quando realizado o teste de difusão em disco. No teste de microdiluição para determinar a CIM, todas as concentrações do extrato de malva mostraram inibição de menos de 40% para todas as cepas de *Candida* em relação ao controle. Em contrapartida, Cardoso et al.¹⁰⁴ (2012) testaram a malva na concentração de 20% determinando a concentração inibitória mínima pelo teste de microdiluição, contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, e encontraram uma boa atividade antifúngica desta planta até mesmo em concentrações mais baixas.

Neste estudo verificamos que o neem apresentou atividade antifúngica nas concentrações de 1:1 até 1:2, pois nas demais concentrações não inibiu nem 50% do crescimento das leveduras em relação ao controle. Esta planta foi mais efetiva na concentração de 1:1, sendo que para a *C. glabrata* houve inibição de 64,64 % do crescimento em relação ao controle, já para *C. albicans* também na concentração de 1:1 a inibição do crescimento foi apenas de 45,59%, valor abaixo daquele encontrado para as outras leveduras. Isto está de acordo parcialmente com Gualtieri et al.¹⁰⁵ 2004, que não encontraram atividade antifúngica do extrato alcóolico de neem para *C. albicans*, mas para *C. krusei* este mostrou-se efetivo. Menezes et al.¹⁰⁶ (2009) testaram o extrato alcóolico do neem sobre cepas de *C. albicans*, pelo método de difusão em disco, assim como utilizado neste estudo. Assim como no presente estudo, nenhum halo de inibição do crescimento de *C. albicans* foi encontrado. O número de estudos citado na literatura, os quais relatam a efetividade do extrato de neem diante dos microrganismos bucais, é pequeno. Esta

planta tem sido muito utilizada como fungicida na agricultura. Polaquini et al.⁸⁸ (2006) testaram a capacidade do neem de inibir a aderência de *C. albicans* à superfície da resina acrílica da base de próteses totais e obtiveram resultados positivos para este teste e sugeriram que mais estudos devem ser realizados para confirmar a efetividade desta planta antes da sua utilização como tratamento contra a *Candida spp.* Fabry et al.⁸⁶ (1996) testaram a atividade antifúngica de plantas indianas tradicionais, dentre elas o neem. Eles determinaram a concentração inibitória mínima dos extratos e verificaram que o neem apresentou atividade antifúngica frente às espécies de *Candida spp.* Assim como no nosso estudo, onde o neem apresentou-se efetivo contra *C. glabrata*, na concentração de 1:1, para *C. krusei* nas concentrações de 1:1 e 1:2 e para *C. tropicalis* nas concentrações de 1:1 e 1:2. Já para o teste de difusão em meio sólido esta planta não apresentou resultado de inibição. Isso talvez possa ser explicado pela origem da planta, época da colheita, entre outros fatores.

Existem vários métodos para avaliar a atividade antifúngica dos extratos naturais. Dentre os mais utilizados estão o método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (Elissa et al.¹⁰⁷ 2008). Para determinar a CMI (concentração inibitória mínima) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998 (Eloff⁹³ 1998). Neste estudo utilizamos dois métodos para verificar a efetividade dos extratos de plantas frente às espécies de *Candida spp.* O teste de difusão em meio sólido (disco de papel), o qual não demonstrou nenhuma atividade antifúngica das plantas testadas, é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (Balows et al.¹⁰⁸ 1991). Existem muitas variações referentes à determinação da CIM (Concentração inibitória mínima) de extratos de plantas, e isso pode ser atribuído a diversos fatores. Dentre eles se podem citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se as plantas utilizadas eram secas ou frescas e a quantidade de extrato testada. Devido a todas estas variações, não existe um método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (Fennel et al.¹⁰³ 2004). O método de microdiluição, para determinação da concentração inibitória mínima, utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Eloff⁹³ (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade

antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. No entanto, ele concluiu que este método é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente (Eloff⁹³ 1998).

O que se pode notar é que há uma infinidade de métodos a serem utilizados para determinar a susceptibilidade de fungos. Fatores como a técnica utilizada, o meio de crescimento, o microrganismo, a planta ou produto natural utilizado, a época da colheita, a técnica realizada para extração e as variações genéticas de uma mesma espécie vegetal podem alterar o teor do princípio ativo presente no extrato. Neste estudo a CIM da própolis foi de 30% para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, e de 1:2 para *C. tropicalis*. A malva não se mostrou efetiva contra nenhuma espécie, e para o neem foi de 1:1 para *C. glabrata*, 1:2 para *C. krusei* e *C. tropicalis*. Sendo assim, com tantas variáveis difíceis de ser controladas e padronizadas, o fato de não ter sido verificado resultado positivo para a atividade antifúngica, no teste de difusão em meio sólido, ou de baixa inibição de crescimento em algumas circunstâncias deste estudo, não invalida os resultados, por isso, mais estudos devem ser realizados a fim de confirmar os resultados obtidos.

7 CONCLUSÕES

O uso de plantas e produtos naturais é muito importante na busca por novos tratamentos para as mais diversas doenças, dentre elas a estomatite protética. No presente estudo os principais achados foram:

- Nenhum dos extratos apresentou atividade antifúngica quando realizado o teste de difusão em meio sólido.
- A própolis apresentou concentração inibitória mínima de 30% para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, e de 20% para *C. tropicalis*.
- A malva não apresentou inibição de crescimento maior de 50% para nenhuma espécie de *Candida*, quando realizado o teste de microdiluição.
- O neem apresentou concentração inibitória mínima de 1:1 para *C. glabrata*, e de 1:2 para *C. krusei* e *C. tropicalis*, não apresentando ação contra *C. albicans*.

Este estudo nos sugere que as plantas estudadas, nas condições em que foram testadas, e limitações, apresentaram baixa atividade antifúngica, no entanto, estudos mais aprofundados de seus componentes devem ser realizados para que se isto seja comprovado, assim como, novos experimentos para determinar a ação destes extratos diante da doença como um todo, não apenas diante de cepas isoladas.

REFERÊNCIAS*

1. McMullan-Vogel GC, Jüde HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1999 Jun;14(3):183-9.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.
3. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001 Apr;14(2):398-429.
4. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol*. 1990 Mar;17(3):138-44.
5. Campostrini EP, Ferreira EF, Rocha FP. Condições da saúde bucal do idoso brasileiro. *Arquivos em Odontologia*. 2007;43(2):48-56.
6. Colussi CFF, Torres SF. Aspectos epidemiológicos da saúde bucal do idoso no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2002;18(5):1313-20.
7. Budtz-Jorgensen E, Bertram U. Denture stomatitis: The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand*. 1970 Mar;28(1):71-92.
8. Kleinegger C, Stoeckel D, Kurago Z. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Jul;92(1):62-7.
9. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*. 2010; Jul;81(5):323-8. Epub 2009 Dec 16.
10. Paiva LCA, Ribeiro RA, Pereira JV, Oliveira NMC. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) sobre candidose oral. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2009 Abr/Jun; 19:423-8.
11. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):359-83.
12. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA.. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001 Mar;80(3):903-8.
13. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jul;98(1):53-9.

*De acordo com a Norma do Programa de Mestrado em Odontologia da UEPG, baseada no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

14. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB.. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. AIDS. 1997 Apr;11(5):557-67.
15. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oralf flora of fluconazole-exposed HIV positive patients. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endodontol. 1998 May;85(5):558-64.
16. Patton LL, Bonito A, Shugars D, Colina C. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endodontol 2001 Aug;92(2):170-9.
17. Patton LL, Shugars AJ. Which antifungal agent is most effective in oropharyngeal candidiasis? Evidence- Based Dentistry 2003;4:14-7.
18. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005 Feb 28;97(2):305-11. Epub 2005 Jan 5.
19. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 2008 Oct;14(7):582-90.
20. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente, e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Mar-Abr;42:222-4.
21. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr. 2004 Jan-Abr;4(1):33-8.
22. de Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J Ethnopharmacol. 2004 Jan;90(1):135-43.
23. Tadege H, Mohammed E, Asres K, Gebre-Marian T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. J Ethnopharmacol. 2005 Aug 22;100(1-2):168-75. Epub 2005 Apr 20.
24. Verma VC, Gond SK, Kumar A, Mishra A, Kharwar RN, Gange AC. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and antimicrobial activity. Microb Ecol. 2009 May;57(4):749-56. Epub 2008 Oct 14.
25. Subapriya R, Nagini S. Medicinal properties of neem leaves: a review. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2005 Mar;5(2):149-6.

26. Santos VR, Gomes RT, de Mesquita RA, de Moura MD, França EC, de Aguiar EG, Naves MD, Abreu JA, Abreu SR. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res*. 2008 Nov;22(11):1544-7.
27. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987 May;14(3):217-27.
28. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998 Oct 24;185(8):380-4.
29. Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000 Oct;28(5):390-8.
30. Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of Candida infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc*. 1978 Mar;96(3):474-9.
31. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW.. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Aust Dent J*. 1998 Feb;43(1):45-50.
32. Budtz-Jorgensen E. The significance of Candida albicans in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.
33. Newton AV. Denture sore mouth. *Br Dent J*. 1962;112:357-9.
34. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol*. 1981 Apr;10(2):65-80.
35. Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, Rompré P, Deslauriers N. Reassessing the presence of Candida albicans in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9.
36. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e139-43.
37. Arikan A, Kulak Y, Kadir T. Comparison of different treatment methods for localized and generalized simple denture stomatitis. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1995 May;22(5):365-9.
38. Castro AL, Furuse TA, Gaettti-Jardim Júnior E, et al. Estomatite protética induzida pelo mau uso de prótese total: Caso Clínico. *Revista Odontológica de Araçatuba*. 2006 Jul-Dez;27(2):87-90.
39. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med*. 2005 Jul;34(6):340-6.

40. Carvalho de Oliveira TR, Frigerio MLMA, Yamada MCM, Birman EG. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. *Pesqui Odontol Bras*. 2000 Jul-Set;14(3):219-24.
41. Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2002 Mar;29(3):300-4.
42. Dikbas I, Koksai T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. *Int J Prosthodont*. 2006 May-Jun;19(3):294-8.
43. Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Mar;97(3):351-8.
44. Baran I, Nalçaci R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Arch Gerontol Geriatr*. 2009 Sep-Oct;49(2):237-41. Epub 2008 Oct 30.
45. Marchini L, Vieira PC, Bossan TP, Montenegro FL, Cunha VP. Self-reported oral hygiene habits among institutionalised elderly and their relationship to the condition of oral tissues in Taubaté, Brazil. *Gerodontology*. 2006 Mar;23(1):33-7.
46. Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):419-24.
47. Evren BA, Uludamar A, Işeri U, Ozkan YK. The association between socioeconomic status, oral hygiene practice, denture stomatitis and oral status in elderly people living different residential homes. *Arch Gerontol Geriatr*. 2011 Nov-Dec;53(3):252-7. Epub 2011 Jan 26
48. Sadig W. The denture hygiene, denture stomatitis and role of dental hygienist. *Int J Dent Hyg*. 2010 Aug;8(3):227-31.
49. Nakashima K, Sato T, Hara T, Minagi S. An experimental study on histopathological changes in the tissue covered with denture base without occlusal pressure. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1994 May;21(3):263-72.
50. Emami E, de Grandmont P, Rompré PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res*. 2008 May;87(5):440-4.
51. Bergendal T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. *Scand J Dent Res*. 1982 Jun;90(3):227-38.
52. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Nov;102(5):632-8. Epub 2006 Jul 14.

53. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, et al. Diretrizes para o tratamento de candidíase. Clin infect dis. 2004;38:161-89.
54. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. The Lancet Infect. 2002 Feb;2(2):73-85.
55. Budtz-Jørgensen E, Løe H. Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1972;80:457-64.
56. Uludamar A, Özyeşil AG, Ozkan YK. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. Gerodontology. 2011 Jun;28(2):104-10. doi: 10.1111/j.1741-2358.2009.00354.x. Epub 2010 Jun 2.
57. Pappas AA, Ray TL. Cutaneous and disseminated skin manifestations of candidiasis. 1998.
58. Sholapurkar AA, Pai KM, Rao S. Comparison of efficacy of fluconazole mouthrinse and clotrimazole mouthpaint in the treatment of oral candidiasis. Aust Dent J. 2009 Dec;54(4):341-6.
59. Koray M, Ak G, Kurklu E, Issever H, Tanyeri H, Kulekci G, Guc U. Fluconazole and/or hexetidine for management of oral candidiasis associated with denture-induced stomatitis. Oral Diseases. 2005 Sep;11(5):309-13.
60. Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999 Out-Dez;13(4):343-348.
61. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA, Baxter W, McEndrick S, McHugh S. High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. Palliat Med. 2003 Sep;17(6):477-81.
62. Redding SW, Marr KA, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF. *Candida glabrata* sepsis secondary to oral colonization in bone marrow transplantation. Med Mycol. 2004 Oct;42(5):479-81.
63. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. J Dent Res. 2007 Mar;86(3):204-15.
64. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, Aguirre JM, Eraso E, Quindós G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. Archives of oral biology. 2009 Feb;54(2):127-31. Epub 2008 Oct 23.
65. Redding SW, Kirkpatrick WR, Saville S, Coco BJ, White W, Fothergill A, Rinaldi M, Eng T, Patterson TF, Lopez-Ribot J. Multiple Patterns of Resistance to Fluconazole in *Candida glabrata* Isolates from a Patient with Oropharyngeal Candidiasis Receiving Head and Neck. Radiation. Journal of clinical microbiology. 2003 Feb;41(2):619-22.

66. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiology Immunology*. 2008 Oct;23(5):377-83.
67. Atique TSC. Pesquisa das espécies e sensibilidade antifúngica de *Candida* sp. em indivíduos soropositivos para o HIV. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2006. p. 154.
68. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, Vergani CE. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun;111(6):726-33.
69. Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 2002;46(12):881-3
70. Gannoum M. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan;13(1):122-43.
71. Oliveira EE, Silva SC, Soares AJ, et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1998 Nov-Dez;31(6):523-7.
72. Ghannoum M, Abu Elteen K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*. 1986 Oct;24(5):407-13.
73. Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 1991;30:3864-74.
74. Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 2001 Feb;56(3):237-43.
75. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil*. 2008 Nov;35(11):836-46. Epub 2008 May 2.
76. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008 Jun;17(4):312-7. Epub 2007 Dec 17.
77. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008;163(1):1-12. Epub 2007 Nov 26.

78. Prates RA, Silva EG, Yamada EM, Paula CR, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *Laser Physics*. 2009;19(5):1038-1044.
79. Carretto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, et al. Effects of the thyme tea on the adherence of *Streptococcus mutans* to dental enamel and *Candida albicans* to acrylic resin. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36:281-6.
80. Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Sep;23(3):176-8.
81. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*. 2002;50:2502-6.
82. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999 Mar;64(3):235-40.
83. Molina FP, Majewski M, Perrela FA, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. *Cienc Odontol Bras*. 2008 Abr-Jun; 11 (2): 86-93.
84. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*. 2001 Nov;44(9-10):375-8.
85. Silici S, Koç NA, Ayangil D, Çankaya S. Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees Against Yeasts Isolated From Patients With Superficial Mycoses. *J Pharmacol Sc*. 2005 Sep;99(1):39-44. Epub 2005 Sep 1.
86. Fabry W, Okemo P, Ansorg R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. *Mycoses*. 1996 Jan-Feb;39(1-2):67-70.
87. SaiRam M, Ilavazhagan G, Sharma SK, Dhanraj SA, Suresh B, Parida MM, Jana AM, Devendra K, Selvamurthy W. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *J Ethnopharmacol*. 2000 Aug;71(3):377-82.
88. Polaquini SRB, Svidzinski TIE, Kemmelmeier C, Gasparetto A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*. 2006 Jun;51(6):482-90. Epub 2006 Jan 10.
89. Atawodi SE, Atawodi JC. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochem Rev*. 2009; 8:601-20.
90. Ali NAA, Jülich WD, Kusnick C, Lindequist U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol*. 2001 Feb;74(2):173-9.
91. Bakshu LDMd, Jeevan Ram A, Raju Venkata RR. Antimicrobial activity of *Securineaga leucopyrus*. *Fitoterapia*. 2001 Dec;72(8):930-3.

92. Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana no extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Farmacogn. 2007 Out-Dez; 17(4):572-577.
93. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med. 1998 Dec;64(8):711-3.
94. Pinto DML, Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. Dissertação - Mestrado em Odontologia. São Paulo: Universidade de São Paulo,;2010.
95. Sawaya AC, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, da Silva Cunha IB, Araujo CE, Shimizu MT. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. Lett Appl Microbiol. 2002;35(3):203-7.
96. Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. J Ethnopharmacol. 2005 Dec 1;102(3):371-6. Epub 2005 Aug 3.
97. Salomão K, Pereira PR, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, de Castro SL. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Evid Based Complement Alternat Med. 2008 Sep;5(3):317-324.
98. Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Braz Journal of Pharma. 2007; 17(3): 466-476.
99. Crişan I, Zaharia CN, Popovici F, Jucu V, Belu O, Dascălu C, Mutiu A, Petrescu A. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. Rom J Virol. 1995 Jul-Dec; 46 (3-4): 115-33Nucci M, Colombo AL. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. Braz J Infect Dis. 2002 Jun 6(3):124-128.
101. Longhinie R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação da sua atividade antifúngica. Rev Bras Farmacognosia. 2007 Jul-Set 17(3):388-395.
102. Santos VR, Pimenta FJGS, Aguiar MCF, do Carmo MAV, Naves MD, Mesquita RA. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. Phytother Res. 2005 Jul;19(7):652-4.
103. Matos BM, Deco CP, Oliveira LD, Jorge AOC, Balducci I, Koga-Ito CY. Comparação da atividade antimicrobiana de soluções de peróxido de hidrogênio e malva sobre *Candida albicans*. Cienc Odontol Bras. 2009 abr./jun. 12 (2): 24-28.

104. Cardoso AMR, Cavalcanti YW, Almeida LFD, Pérez ALAL, Padilha WWL. Antifungal activity of plant-based tinctures on *Candida*. RSBO. 2012 Jan-Mar;9(1):25-30.
105. Gualtieri M, Villata C, Guillén AM, Lapenna E. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la *Azadirachta Indica* A. Juss (Neem). INHRR. 2004; 35(1):1-7.
106. Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Rev Odontol da UNESP. 2009; 38(3): 184-91.
107. Elissa AO, Miriam KM, Marcos ELL, Telma MK, Suzana ON, Beatriz RF. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. 18(2):301-307.
108. Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology. 1991;5:1117-1125.
109. Fennel CW, Lindsey KL, Mc Gaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, Grace OM, Van Staden J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. J. Ethnopharmacol. 2004 Oct;94(2-3):205-17.

APÊNDICE A

Resultados obtidos pelo leitor de placa da absorbância das placas de 96 poços, antes do tratamento dos dados.

Tabela 1 – Valores da primeira leitura para *C. albicans* placa 1.

C. A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,224	1,973	1,512	0,655	0,62	0,369	0,199	0,202	0,802	0,332	0,197	0,073
B	0,183	1,977	1,509	0,724	0,684	0,289	0,228	0,208	0,673	0,286	0,292	0,192
C	0,172	1,97	1,963	0,869	1,027	0,335	0,257	0,261	0,968	0,422	0,24	0,157
D	0,217	1,978	1,887	0,818	0,96	0,349	0,297	0,284	1,142	0,444	0,222	0,195
E	0,203	0,229	1,568	0,507	0,49	0,3	0,294	0,285	0,401	0,36	0,25	0,125
F	0,174	0,236	1,423	0,6	0,582	0,324	0,288	0,268	0,514	0,349	0,253	0,207
G	0,165	0,215	1,48	0,578	0,436	0,313	0,263	0,266	0,437	0,165	0,226	0,216
H	0,117	0,209	1,272	0,372	0,197	0,075	0,05	0,049	0,451	0,205	0,091	0,041

Tabela 2 – Valores da primeira leitura para *C. albicans* placa 2.

C.A.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	1,949	2,222	1,023	1,128	0,15	0,149	0,196	0,94	0,281	0,271	0,045
B	0,284	2,007	2,323	1,228	1,428	0,143	0,223	0,218	1,016	0,285	0,256	0,248
C	0,286	1,974	2,281	1,238	0,99	0,168	0,226	0,233	1,592	0,555	0,305	0,321
D	0,286	1,963	2,418	1,321	1,011	0,206	0,177	0,214	1,515	0,335	0,32	0,166
E	0,358	0,259	1,922	0,71	0,596	0,345	0,264	0,323	0,56	0,338	0,115	0,058
F	0,324	0,288	2,074	0,695	0,599	0,172	0,277	0,172	0,862	0,36	0,19	0,068
G	0,316	0,312	1,735	0,767	0,675	0,165	0,139	0,324	0,637	0,14	0,118	0,157
H	0,074	0,234	1,7	0,649	0,535	0,101	0,059	0,277	0,774	0,161	0,152	0,037

Tabela 2 – Valores da segunda leitura para *C. albicans* placa 1.

C.A.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	2,046	1,326	0,68	0,298	0,103	0,053	0,046	0,68	0,138	0,079	0,051
B	0,041	1,97	1,343	0,698	0,394	0,1	0,058	0,048	0,604	0,122	0,064	0,049
C	0,043	1,959	1,904	0,841	0,347	0,129	0,057	0,048	0,811	0,171	0,065	0,048
D	0,041	1,984	1,923	0,746	0,358	0,114	0,058	0,045	0,914	0,174	0,068	0,049
E	0,112	0,06	1,686	0,325	0,218	0,068	0,058	0,053	0,279	0,094	0,062	0,047
F	0,05	0,042	1,407	0,339	0,246	0,071	0,049	0,048	0,274	0,092	0,063	0,057
G	0,052	0,043	1,36	0,314	0,186	0,072	0,063	0,058	0,206	0,111	0,068	0,059
H	0,909	0,049	1,39	0,339	0,164	0,067	0,048	0,049	0,28	0,081	0,051	0,045

Tabela 3 – Valores da segunda leitura para *C. albicans* placa 2.

C.A.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,043	1,968	2,165	1,007	0,684	0,096	0,055	0,047	0,763	0,122	0,062	0,046
B	0,043	2	2,143	0,979	1,149	0,172	0,054	0,046	0,766	0,116	0,064	0,047
C	0,043	1,978	2,153	1,103	0,584	0,113	0,057	0,047	1,157	0,314	0,067	0,051
D	0,041	1,958	2,362	1,176	0,759	0,176	0,058	0,048	1,055	0,156	0,079	0,072
E	0,109	0,109	1,935	0,513	0,688	0,131	0,1	0,093	0,317	0,11	0,08	0,072
F	0,086	0,065	1,988	0,452	0,329	0,094	0,083	0,088	0,519	0,142	0,122	0,126
G	0,05	0,05	1,676	0,481	0,3	0,122	0,106	0,108	0,424	0,173	0,132	0,13
H	0,048	0,043	1,661	0,427	1,033	0,076	0,047	0,045	0,424	0,087	0,051	0,047

Tabela 4 – Valores da primeira leitura para *C. glabrata* placa 1.

C.G.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,223	2,106	2,531	1,3	1,235	0,232	0,285	0,3	1,473	0,412	0,275	0,14
B	0,241	2,03	2,555	1,402	1,203	0,369	0,277	0,267	1,591	0,458	0,308	0,252
C	0,248	2,112	2,473	1,511	1,207	0,398	0,312	0,278	1,583	0,377	0,292	0,252
D	0,248	2,125	2,572	1,345	1,354	0,396	0,281	0,248	1,733	0,378	0,296	0,319
E	0,275	0,221	2,25	0,858	0,703	0,343	0,27	0,237	0,717	0,399	0,226	0,24
F	0,291	0,24	2,29	0,784	0,732	0,377	0,314	0,264	0,647	0,277	0,223	0,241
G	0,237	0,278	2,278	0,808	0,689	0,346	0,321	0,29	0,666	0,39	0,286	0,269
H	0,279	0,196	2,18	0,82	0,616	0,31	0,305	0,232	0,647	0,345	0,271	0,149

Tabela 5 – Valores da primeira leitura para *C. glabrata* placa 2.

C.G.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,139	2,104	2,516	1,379	1,416	0,373	0,298	0,281	1,367	0,426	0,296	0,221
B	0,26	2,033	2,403	1,31	1,258	0,459	0,294	0,26	1,22	0,4	0,228	0,263
C	0,27	2,101	2,588	1,324	1,41	0,418	0,318	0,26	1,06	0,406	0,234	0,262
D	0,25	2,201	2,405	1,119	1,376	0,42	0,192	0,29	1,287	0,377	0,229	0,12
E	0,194	0,329	1,832	0,754	0,587	0,271	0,083	0,117	0,986	0,352	0,268	0,125
F	0,069	0,313	2,208	0,593	0,39	0,15	0,131	0,193	0,514	0,345	0,32	0,068
G	0,182	0,243	2,232	0,688	0,595	0,235	0,107	0,175	0,688	0,161	0,095	0,222
H	0,244	0,117	2,257	0,773	0,64	0,353	0,312	0,355	0,567	0,13	0,163	0,071

Tabela 6 – Valores da segunda leitura para *C. glabrata* placa 1.

C.G.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	2,053	2,301	1,249	1,074	0,118	0,056	0,045	1,235	0,15	0,06	0,046
B	0,04	1,959	2,252	1,174	0,913	0,117	0,054	0,044	0,838	0,209	0,069	0,046
C	0,041	1,985	2,141	1,12	0,487	0,122	0,059	0,047	0,852	0,162	0,068	0,044
D	0,039	2,023	2,207	1,206	0,21	0,115	0,06	0,053	1,158	0,195	0,092	0,076
E	0,118	0,122	2,047	0,611	0,407	0,141	0,107	0,096	0,46	0,145	0,087	0,075
F	0,103	0,091	2,033	0,549	0,323	0,129	0,103	0,106	0,494	0,175	0,141	0,137
G	0,055	0,057	1,973	0,516	0,314	0,125	0,095	0,104	0,474	0,189	0,141	0,136
H	0,051	0,047	1,932	0,533	0,859	0,075	0,047	0,044	0,419	0,124	0,049	0,046

Tabela 7 – Valores da segunda leitura para *C. glabrata* placa 2.

C.G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	2,04	2,29	1,211	0,523	0,102	0,054	0,045	0,906	0,141	0,066	0,048
B	0,043	1,966	2,153	1,109	0,299	0,119	0,062	0,045	0,69	0,171	0,058	0,048
C	0,043	2,029	2,402	1,198	1,2	0,163	0,057	0,046	0,652	0,169	0,07	0,051
D	0,043	2,151	2,374	1,039	0,797	0,122	0,062	0,051	0,921	0,205	0,072	0,065
E	0,084	0,093	1,74	0,59	0,325	0,12	0,086	0,074	0,622	0,131	0,071	0,063
F	0,059	0,049	1,907	0,478	0,489	0,092	0,064	0,063	0,33	0,122	0,087	0,086
G	0,041	0,044	1,913	0,531	0,327	0,08	0,056	0,059	0,384	0,135	0,096	0,086
H	0,042	0,046	1,913	0,581	0,254	0,081	0,051	0,047	0,395	0,094	0,052	0,043

Tabela 8 – Valores da primeira leitura para *C. tropicalis* placa 1.

C.T.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,055	2,031	2,47	1,321	1,588	0,316	0,244	0,254	1,346	0,175	0,125	0,045
B	0,081	2,06	2,268	1,519	1,686	0,473	0,273	0,235	0,849	0,394	0,096	0,05
C	0,05	2,049	2,14	1,355	1,554	0,556	0,272	0,263	1,273	0,153	0,227	0,041
D	0,039	2,062	2,186	1,473	1,524	0,459	0,246	0,257	1,358	0,321	0,306	0,129
E	0,047	0,093	1,955	0,729	0,905	0,237	0,231	0,239	0,563	0,176	0,162	0,048
F	0,041	0,179	1,941	0,72	0,936	0,359	0,217	0,235	0,921	0,331	0,239	0,042
G	0,046	0,216	2,07	0,944	0,886	0,337	0,274	0,257	0,863	0,269	0,231	0,096
H	0,044	0,168	2,175	0,878	0,923	0,37	0,277	0,235	0,585	0,3	0,217	0,058

Tabela 9 – Valores da primeira leitura para *C. tropicalis* placa 2.

C.T.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	2,02	2,71	1,425	1,232	0,405	0,336	0,284	1,353	0,352	0,191	0,047
B	0,044	2,042	2,673	1,355	1,162	0,428	0,376	0,302	1,597	0,41	0,311	0,14
C	0,172	1,567	2,169	1,463	1,562	0,383	0,363	0,282	1,645	0,486	0,341	0,271
D	0,269	1,906	2,709	1,473	1,307	0,456	0,357	0,327	1,614	0,392	0,364	0,315
E	0,228	0,322	2,363	0,745	0,635	0,359	0,311	0,316	0,833	0,351	0,281	0,288
F	0,196	0,278	2,404	0,978	0,987	0,404	0,346	0,338	0,862	0,354	0,33	0,33
G	0,041	0,181	1,972	0,985	0,982	0,372	0,365	0,33	0,799	0,348	0,29	0,231
H	0,042	0,279	1,999	0,651	0,978	0,328	0,302	0,254	0,544	0,269	0,16	0,043

Tabela 10 – Valores da segunda leitura para *C. tropicalis* placa 1.

C.T.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	1,969	2,352	1,195	0,586	0,174	0,055	0,044	1,001	0,168	0,071	0,045
B	0,041	1,966	2,543	1,096	0,845	0,106	0,063	0,044	1,278	0,11	0,056	0,046
C	0,043	1,827	2,052	1,259	1,352	0,133	0,064	0,048	1,181	0,198	0,063	0,047
D	0,26	1,824	2,333	1,204	0,72	0,148	0,056	0,051	1,152	0,164	0,1	0,077
E	0,369	0,107	1,998	0,516	0,388	0,14	0,106	0,094	0,498	0,14	0,086	0,077
F	0,114	0,059	2,13	0,594	0,558	0,116	0,073	0,075	0,493	0,147	0,11	0,107
G	0,083	0,047	1,962	0,649	0,587	0,098	0,077	0,084	0,844	0,16	0,126	0,109
H	0,171	0,045	1,982	0,387	0,965	0,073	0,048	0,044	0,517	0,083	0,051	0,042

Tabela 11 – Valores da segunda leitura para *C. tropicalis* placa 2.

C.T.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	1,943	2,229	1,04	1,04	0,134	0,053	0,044	1,078	0,159	0,058	0,046
B	0,041	1,972	2,057	1,3	1,096	0,217	0,065	0,046	0,548	0,225	0,063	0,048
C	0,045	1,991	2,069	1,114	1,09	0,235	0,067	0,048	1,362	0,155	0,068	0,047
D	0,043	1,98	2,116	1,397	1,37	0,223	0,072	0,051	1,233	0,177	0,092	0,078
E	0,1	0,115	1,937	0,618	0,65	0,147	0,113	0,104	0,418	0,135	0,089	0,08
F	0,073	0,06	1,914	0,594	0,495	0,111	0,061	0,059	0,657	0,11	0,092	0,097
G	0,04	0,043	2,012	0,642	0,428	0,136	0,08	0,084	0,448	0,142	0,113	0,104
H	0,044	0,043	1,927	0,609	0,484	0,106	0,051	0,044	0,394	0,078	0,048	0,044

Tabela 12 – Valores da primeira leitura para *C. krusei* placa 1.

C.K.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,041	2,163	2,669	1,516	0,997	0,323	0,243	0,245	1,625	0,404	0,312	0,05
B	0,185	2,187	2,741	1,541	0,844	0,319	0,225	0,192	1,63	0,328	0,279	0,254
C	0,249	2,248	2,843	1,531	1,106	0,336	0,242	0,245	1,703	0,328	0,293	0,196
D	0,225	2,309	2,638	1,56	1,086	0,378	0,222	0,228	1,535	0,328	0,264	0,209
E	0,205	0,214	2,42	0,759	0,578	0,279	0,207	0,196	0,945	0,27	0,328	0,283
F	0,251	0,263	2,404	0,838	0,954	0,328	0,243	0,222	0,661	0,264	0,282	0,204
G	0,178	0,195	2,31	0,758	0,666	0,371	0,295	0,246	1,053	0,275	0,275	0,185
H	0,043	0,255	2,348	0,928	0,583	0,215	0,295	0,263	0,748	0,391	0,082	0,054

Tabela 13 – Valores da primeira leitura para *C. krusei* placa 2.

C.K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	2,095	2,658	1,011	1,027	0,215	0,059	0,046	0,993	0,155	0,067	0,048
B	0,042	2,118	2,651	1,472	1,019	0,365	0,271	0,24	1,444	0,343	0,181	0,047
C	0,041	2,283	2,71	1,22	1,185	0,426	0,309	0,305	1,027	0,378	0,145	0,049
D	0,04	2,294	2,755	1,124	1,016	0,447	0,302	0,266	1,044	0,387	0,217	0,05
E	0,04	0,174	2,212	0,681	0,444	0,435	0,178	0,166	0,424	0,313	0,27	0,046
F	0,041	0,157	2,197	0,719	0,505	0,123	0,251	0,241	0,658	0,261	0,15	0,044
G	0,039	0,06	2,251	0,607	0,628	0,101	0,085	0,045	0,735	0,099	0,053	0,045
H	0,041	0,043	1,401	0,438	0,306	0,085	0,043	0,044	0,758	0,103	0,05	0,044

Tabela 14 – Valores da segunda leitura para *C. krusei* placa 1.

C.K.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	2,045	2,513	1,282	0,587	0,114	0,055	0,047	1,328	0,188	0,066	0,049
B	0,04	2,012	2,647	1,281	0,722	0,131	0,057	0,047	1,418	0,18	0,069	0,051
C	0,043	2,037	2,664	1,231	0,645	0,124	0,059	0,047	1,46	0,177	0,069	0,049
D	0,04	2,07	2,434	1,204	0,625	0,139	0,058	0,046	1,316	0,185	0,075	0,055
E	0,043	0,05	2,38	0,517	0,416	0,087	0,055	0,05	0,439	0,104	0,059	0,049
F	0,046	0,044	2,032	0,543	0,604	0,085	0,051	0,048	0,379	0,101	0,06	0,062
G	0,039	0,045	1,884	0,6	0,328	0,101	0,052	0,046	0,708	0,098	0,066	0,057
H	0,041	0,044	1,874	0,646	0,467	0,083	0,05	0,046	0,54	0,15	0,054	0,051

Tabela 15 – Valores da segunda leitura para *C. krusei* placa 2.

C.K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	2,647	2,509	0,893	1,63	0,183	0,054	0,046	0,874	0,146	0,066	0,047
B	0,043	2,594	2,514	1,192	0,753	0,218	0,055	0,046	1,304	0,154	0,065	0,047
C	0,041	2,821	2,546	1,144	1,892	0,197	0,056	0,048	1,056	0,162	0,069	0,048
D	0,039	2,871	2,565	1,118	2,305	0,211	0,082	0,051	1,102	0,18	0,082	0,072
E	0,091	0,107	2,036	0,587	0,537	0,217	0,089	0,081	0,405	0,14	0,079	0,07
F	0,074	0,06	1,954	0,57	0,468	0,103	0,08	0,081	0,445	0,182	0,107	0,105
G	0,04	0,045	1,984	0,488	0,435	0,089	0,057	0,068	0,491	0,15	0,138	0,108
H	0,04	0,045	1,379	0,389	0,384	0,077	0,044	0,044	0,456	0,097	0,051	0,044