

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Henrique Côrtes Meira

**Avaliação *in-vitro* da atividade antifúngica e da
citotoxicidade da própolis de copaíba contra espécies do
gênero *Candida* spp.**

BELO HORIZONTE/MG – 2017

Henrique Côrtes Meira

**Avaliação *in-vitro* da atividade antifúngica e da
citotoxicidade da própolis de copaíba contra espécies do
gênero *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Vagner Rodrigues Santos

Ficha Catalográfica

M514a Meira, Henrique Côrtes.
2017 Avaliação in-vitro da atividade antifúngica e da
T citotoxicidade da própolis de copaíba contra espécies do
gênero Candida spp / Henrique Côrtes Meira. -- 2017.

65 f. : il.

Orientador: Vagner Rodrigues Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Candidíase Bucal. 2. Própole. 3. Antissépticos Bucais. 4. Candida. I. Santos, Vagner Rodrigues. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



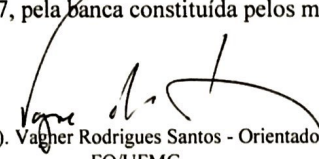
FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação in-vitro da atividade antifúngica e da citotoxicidade da própolis de copaíba contra espécies do gênero *Candida* spp.

HENRIQUE CÔRTEZ MEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 31 de julho de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Vagner Rodrigues Santos - Orientador
FO/UFMG


Prof(a). Hermínia Marques Capistrano
PUCMG


Prof(a). Lia Silva de Castilho
FO/UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2017.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO HENRIQUE CÔRTEZ MEIRA

Aos 31 dias de julho de 2017, às 08:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Vagner Rodrigues Santos (Orientador) – FO/UFMG, Herminia Marques Capistrano – PUC-MG e Lia Silva de Castilho – FO/UFMG, para julgamento da dissertação de Mestrado, área de concentração em Estomatologia, intitulada: **Avaliação in-vitro da atividade antifúngica e da citotoxicidade da própolis de copaíba contra espécies do gênero Candida spp.** O Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou a dissertação:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 31 de julho de 2017.

Prof(a). Vagner Rodrigues Santos

Prof(a). Herminia Marques Capistrano

Prof(a). Lia Silva de Castilho

DEDICATÓRIA

À minha família: especialmente à minha esposa Natália, aos meus pais Milton e Binha, ao meu irmão Hugo e os meus amados avós *in memoriam* Izael e Disa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser o alicerce em minha vida e fortaleza nos momentos de dificuldade.

Obrigado Natália pelo apoio incondicional, paciência e amor. Sem você o caminho até aqui teria sido muito mais difícil. Te amo!

Aos meus pais Milton e Binha. Pai, exemplo de homem e integridade e mãe de amor e cuidado. Ao meu irmão Hugo por ser meu melhor amigo e sempre presente. Vocês são os pilares da minha vida e tudo que faço é pensando em vocês!

Aos meus tios, primos, cunhados, sogro e sogra e minha avó Dalva por torcerem e rezarem por mim em todas as situações. Ao meu avô Zai e minha vovó Disa, que ao lado de Deus olham por mim. Saudades eternas.

Ao meu orientador Prof. Vagner Santos pela paciência, empenho e amizade. Você foi essencial nessa trajetória.

À todos os colaboradores desse trabalho, em especial à profa. Maria Esperanza Cortez (Faculdade de Odontologia-UFMG), professores Rachel Oliveira Castilho, André Faraco e equipe (Faculdade de Farmácia-UFMG), Ana Delia Pinzón García (Faculdade de Química-UFMG) e ao estudante Felipe Chaim (Iniciação Científica). À empresa Pharmanectar pelo fornecimento do material estudado.

À todos os professores da área de Estomatologia por acrescentarem muito aos meus conhecimentos na área.

Aos meus colegas de mestrado, em especial ao Igor, Andrea, Aline e Flávia, por dividirem suas experiências, dúvidas e risadas. Aos alunos de graduação pela sempre boa vontade de ajudar. À todos alunos, colegas e pacientes do projeto de Oncologia pela vivência todas sextas-feiras à tarde.

Aos colegas de profissão, pacientes e equipe de trabalho por compreenderem minhas ausências nesses dois anos e darem suporte para que tudo ocorresse bem, em especial à Cristina. À equipe do Aperfeiçoamento em Implantodontia da UFMG por acompanharem e participarem dessa caminhada: Prof. Evandro Aguiar, Luiz Novy, Cris e Chayene.

Aos meus bons e velhos amigos que fazem a minha vida mais completa. Com vocês tudo fica mais fácil e divertido.

*“Deus, dai-me **serenidade** para aceitar as coisas que eu não posso mudar, **coragem** para mudar as que eu posso e **sabedoria** para distinguir uma das outras.”*

Reinhold Niebuhr

RESUMO

OBJETIVOS: verificar a atividade antifúngica e a citotoxicidade da própolis de copaíba e de um protótipo de enxaguante bucal contra espécies do gênero *Candida* spp.

METODOLOGIA: o perfil cromatográfico do extrato de própolis foi realizado por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência em Fase Reversa (RP-UPLC). A atividade antifúngica do extrato de própolis de copaíba (EPC) e do seu protótipo de enxaguante bucal contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foi avaliada por microdiluição em caldo e disco-difusão em ágar. A citotoxicidade foi verificada pelo ensaio de MTT em fibroblastos 3T3 – L1.

RESULTADOS: Fenóis foram os principais compostos encontrados, sendo identificados dentre eles o ácido caféico (ácido fenólico) e canferol (flavonóide). Os valores de CIM foram 156 µg/ml, 312 µg/ml e 625 µg/ml para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* respectivamente, indicando atividade antifúngica presente, mas moderada. Os valores das zonas de inibição verificaram inibição do crescimento das leveduras e sugeriram uma atividade fungistática do enxaguante bucal. Em relação aos testes de citotoxicidade, o EPC exerce, em baixas concentrações, um efeito dose dependente sobre a proliferação de fibroblastos 3T3-L1 e pode exercer um efeito regenerador de tecidos. **CONCLUSÕES:** a própolis investigada apresenta potencial antifúngico moderado contra *Candida* spp., podendo ser o enxaguante bucal uma opção terapêutica no combate da candidíase oral, já que o seu tratamento é baseado no controle e não na erradicação das leveduras. Estudos futuros sobre a caracterização dos seus compostos químicos, aperfeiçoamento do produto e ensaios clínicos deverão ser realizados.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis; Copaiba; *Candida* spp.; Enxaguante bucal.

In-vitro evaluation of the antifungal activity and cytotoxicity of copaiba propolis against Candida spp.

ABSTRACT

OBJECTIVES: verify the antifungal activity and cytotoxicity of copaiba propolis and its mouthwash prototype against *Candida* spp. **METHODOLOGY:** the chromatographic profile of the propolis extract was performed by Reverse Phase Ultra-efficiency Liquid Chromatography (RP-UPLC). The antifungal activity of copaiba propolis extract (CPE) and its mouthwash prototype against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* was evaluated by microdilution broth method and agar disk-diffusion. Cytotoxicity was verified by the MTT assay on 3T3-L1 fibroblasts. **RESULTS:** Phenols were the main compounds found, among them caffeic acid (phenolic acid) and canferol (flavonoid). The MIC values were 156 µg/ml, 312 µg/ml and 625 µg/ml for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei* respectively, indicating present but moderate antifungal activity. The values of the inhibition zones suggested a fungistatic activity of the oral rinse. In relation to cytotoxicity tests, CPE exerts a dose-dependent effect on the 3T3-L1 fibroblasts proliferation at low concentrations and may exert a tissue regenerative effect. **CONCLUSIONS:** the investigated propolis has a moderate antifungal potential against *Candida* spp., and mouthwash may be a therapeutic option in the fight against oral candidiasis, since its treatment is based on control and not on the eradication of yeast. Future studies on the characterization of its chemical compounds, product enhancement and clinical trials should be performed.

KEYWORDS: Propolis; Copaiba; *Candida* spp.; Mouthwash.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Sequência de formação do biofilme da <i>Candida</i> spp. (Fonte: SENEVIRATNE e SAMARANAYAKE, 2008)..... | 16 |
| Figura 2 - Candidíase pseudomembranosa em paciente fazendo uso de corticóide inalatório. Placas brancas removíveis em dorso de língua (A) e palato mole (B)..... | 18 |
| Figura 3 - Candidíase atrófica aguda: área eritematosa em palato. (Foto cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Drumond Naves)..... | 19 |
| Figura 4 - Estomatite protética. Área eritematosa restrita à área de contato de uma prótese parcial removível..... | 19 |
| Figura 5 - Glossite rombóide mediana: área eritematosa de atrofia papilar no centro da língua. (Imagem cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita) | 20 |
| Figura 6 - Queilite angular em paciente portadora de prótese total superior com alteração da dimensão vertical de oclusão..... | 21 |
| Figura 7 -Cromatogramas por RPHPLC dos extratos etanólicos de própolis e resinas das plantas (Fonte: PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002)..... | 26 |
| Figura 8 :Aspecto físico das amostras de própolis brutas verde (A) e vermelha (B) brasileiras. (Fonte: SANTOS, 2012)..... | 27 |
| Figura 9 - Alguns compostos fenólicos e flavonóides típicos da própolis verde. (Fonte: TORETI <i>et al</i> , 2013). | 28 |
| Figura 10 : Semente de <i>Copaifera</i> spp. (Fonte: http://ibflorestas.org.br/loja/sementes/semente-copaiba.html). | 32 |
| Figura 11 - Amostra da própolis de copaíba bruta..... | 35 |
| Figura 12 - Protótipo de enxaguante bucal a base de própolis de copaíba a 10%..... | 37 |
| Figura 13 : Esquema de microdiluição em caldo. Poços de 1 a 8: microdiluição do EPC; poços 9: controle negativo (CN)- meio de cultura puro; poços 10: controle positivo (CP) - Nistatina); poços 11: protótipo de enxaguante bucal com PC (E); poços 12: protótipo de enxaguante bucal sem PC (branco- B). | 40 |
| Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-UV/DAD para o extrato etanólico de PC em comprimento de onda de detecção de 210 nm..... | 43 |
| Figura 15 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-UV/DAD para o extrato etanólico de PC em comprimento de onda de detecção de 335 nm..... | 43 |
| Figura 16 - Espectro de ultravioleta para o pico eluído em tempo de retenção de 5,830 min, obtidos on line no UPLC UV/DAD para o extrato etanólico de própolis de copaíba..... | 44 |
| Figura 17 - A: Espectro de ultravioleta para da solução de canferol padronizada. B: pico eluído em tempo de retenção de 9,568 min para o extrato etanólico de própolis de copaíba | 44 |
| Figura 18 - A: Espectro de ultravioleta para da solução de ácido caféico padronizada. B: pico eluído em tempo de retenção de 4,055 min para o extrato etanólico de própolis de copaíba..... | 45 |
| Figura 19 - Coloração das colônias pelo método do CHROMagar Candida Medium. A- <i>C. albicans</i> : coloração verde-claro; B- <i>C. tropicalis</i> :coloração azul metalizado; C- <i>C. krusei</i> : coloração cor-de-rosa claro. | 46 |
| Figura 20 - Efeito do extrato de própolis na viabilidade celular de fibroblastos 3T3-L1 em 24h e 48h. Controle ST (sem tratamento)..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 - Principais agentes antifúngicos tópicos contra a candidíase oral..... | 22 |
| Tabela 2 - Principais agentes antifúngicos sistêmicos via oral contra a candidíase oral..... | 23 |
| Tabela 3 - Gradiente de eluição empregado na obtenção do perfil exploratórios por UPLC-UV/DAD para o extrato de própolis..... | 36 |
| Tabela 4 -Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do EPC contra <i>Candida</i> spp..... | 46 |
| Tabela 5 - Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) das zonas de inibição do diâmetro obtidas no teste de difusão em ágar utilizando o EPC a 25% e protótipo de enxaguante bucal a 10% contra <i>Candida</i> spp..... | 47 |
| Tabela 6 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de extratos de própolis contra espécies de <i>Candida</i> spp..... | 51 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS- *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- *American Type Culture Collection*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI- *Clinical & Laboratory Standards Institute*

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EEP- extrato etanólico de própolis

EPC- Extrato de própolis de copaíba

FDA - *Food and Drugs Administration*

GC- MS - *Gas chromatography-mass spectrometry*

HAART -*Highly active antiretroviral therapy*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

LC-MS - Cromatografia líquida com espectrômetro de massa

MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

PAS- *Periodic acid-schiff*

PBS - Phosphate buffered saline

PC - Própolis de copaíba

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PVDF- Fluoreto de polivinilideno

RPHPLC - *Reversed-phase high- performance liquid chromatography*

RP-UPLC - *Reverse-phase ultra performance liquid chromatography*

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

Spp. - espécies

UFC - Unidades formadoras de colônias

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

XTT- (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -Hidróxido de 5 - [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazólio)

WHO -*World Health Organization*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 - Candidíase oral | 15 |
| 2.1.1 - Definição, patogênese e fatores de risco | 15 |
| 2.1.2 - Aspectos clínicos | 17 |
| 2.1.3 - Diagnóstico e tratamento | 21 |
| 2.2 - Própolis | 24 |
| 2.2.1 - Definição e características | 24 |
| 2.2.2 - Composição química e classificação | 25 |
| 2.2.3 - Funções biológicas e aplicações terapêuticas | 29 |
| 2.3- Copaíba | 31 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 - Objetivo geral | 34 |
| 3.2 - Objetivos específicos | 34 |
| 4. METODOLOGIA | 35 |
| 4.1 - Própolis | |
| 4.2 – Perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-UV/DAD) | 36 |
| 4.2.1 - Preparo das amostras | 36 |
| 4.2.2 - Comparação com padrões de referência | 37 |
| 4.3 - Enxaguante bucal | 37 |
| 4.4 - Microorganismos | 38 |
| 4.5 – Testes de susceptibilidade antifúngica | 39 |
| 4.5.1 - Microdiluição em caldo | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.2 - Difusão em ágar | 41 |
| 4.6 - Teste de citotoxicidade | 41 |
| 4.6.1 - Ensaio de MTT em fibroblastos 3T3 – L1 | 42 |
| 5. RESULTADOS | 43 |
| 5.1 - Perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-UV/DAD) | 43 |
| 5.2 - Susceptibilidade antifúngica | 45 |
| 5.3 - Citotoxicidade | 47 |
| 6. DISCUSSÃO | 48 |
| 7. CONCLUSÕES | 55 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

1 - INTRODUÇÃO

A descoberta da atividade farmacológica de novos agentes fitoterápicos é de grande importância, principalmente no Brasil, um país rico em biodiversidade. Encontrar substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência de microrganismos patogênicos pode contribuir significativamente no campo da saúde em nível mundial (OSTROSKY *et al.*, 2008; FREIRES *et al.*, 2016).

A candidíase é uma infecção fúngica comum da cavidade oral, provocada por leveduras do gênero *Candida* spp. (LYNCH, 1994; AKPAN e MORGAN, 2002). Afeta predominantemente idosos, usuários de próteses removíveis, pacientes submetidos ao uso prolongado de antibióticos e corticosteróides, quimioterapia ou radioterapia de cabeça e pescoço, indivíduos com xerostomia e aqueles com deficiência imunológica, como no caso da AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (World Health Organization, 2014).

Os principais fatores de virulência das espécies de *Candida* spp. são sua capacidade de se adaptar e crescer em diversos habitat e de formar biofilme. Microorganismos capazes de formar biofilmes muitas vezes causam infecções crônicas com alta tolerância a antifúngicos e resistência do sistema imunológico (SENEVIRATNE e SAMARANAYAKE, 2008; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013).

Os produtos naturais são alternativas terapêuticas promissoras, já que possuem menos efeitos adversos e de menor intensidade quando comparados aos fármacos convencionais e podem ser alternativas viáveis e de baixo custo para o tratamento de doenças orais (VICENTE *et al.*, 2003; CORREIA *et al.*, 2016).

A própolis é uma substância natural coletada por abelhas, sendo utilizada na medicina popular há séculos. Sua composição química é complexa e a cor varia dependendo da localização onde é coletada: savanas, florestas tropicais, desertos, regiões costeiras e montanhosas (BURDOCK, 1998; SANTOS, 2012). Trata-se de um material resinoso coletado pelas abelhas de brotos e exsudados das plantas, misturado com enzimas de abelhas, pólen e cera (SFORCIN, 2016).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de própolis no mundo (SANTOS, 2012) e atualmente já são conhecidas diversas das suas funções biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora e bioestimuladora (BURDOCK, 1998;

BANKOVA, 2005; WHAG, 2013; SFORCIN, 2016). As propriedades antifúngicas contra espécies do gênero *Candida* spp. já foram demonstradas *in vitro* por diversos autores (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2002; de PAULA *et al.*, 2006; MELLO *et al.*, 2006; AKCA *et al.*, 2016; FREIRES *et al.*, 2016). Além disso, Santos *et al.* (2005, 2008), Capistrano *et al.* (2013) e Pina *et al.* (2017) demonstraram, *in vivo*, que a própolis verde brasileira é uma alternativa no tratamento de pacientes com estomatite protética por *Candida* spp.

Além da própolis, diversos produtos naturais tem sido descritos como fonte potencial de novos fármacos e seletivos para o tratamento de doenças infecciosas, dentre eles o óleo-resina de copaíba. O bálsamo de copaíba, obtido através de pequenos cortes na casca do caule da planta é amplamente utilizado na medicina popular, tanto na forma tópica, como oral. Das várias indicações terapêuticas, algumas já foram confirmadas: anti-inflamatória, cicatrização de feridas, antimicrobiana, leishmanicida, antineoplásica e anestésica (PIERI; MUSSI e MOREIRA, 2009; LEANDRO *et al.*, 2012). Deus *et al.* (2009) e Deus, Alves e Arruda (2011) avaliaram a ação antifúngica *in vitro* da espécie de copaíba *C. multijuga* Hayne e concluíram que seu óleo apresenta bom potencial de ação antimicrobiana contra microorganismos dos gêneros *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., podendo ser um bom indicativo para estudos mais específicos no combate à candidose e aspergilose.

A própolis brasileira é classificada em 13 grupos com base nas suas características físico-químicas, sendo uma das principais própolis estudadas, pela sua rica composição química e seu elevado valor terapêutico (PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002; ALENCAR *et al.*, 2007). No entanto, a simples afirmação de que certa amostra corresponde à "própolis brasileira" dificilmente significa qualquer indicação de características físicas, químicas e biológicas, pois existe uma grande diversidade de tipos de própolis no Brasil, sendo necessário estudos mais aprofundados (PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002).

Pesquisar novos antimicrobianos de origem natural, especificamente antifúngicos, com maior eficácia, baixa toxicidade, menor custo e fácil acessibilidade é muito importante. Nesta direção, extratos de própolis são uma opção vantajosa frente a muitos antifúngicos convencionais existentes no mercado farmacêutico. Até o presente momento, não há relatos na literatura de amostras de própolis cuja origem botânica seja a *Copaifera* spp., cujo óleo é amplamente usado na medicina popular.

O objetivo desse estudo foi investigar a citotoxicidade e a atividade antifúngica, *in vitro*, contra *Candida* spp. do extrato e de um protótipo de enxaguante bucal a base de uma própolis originada de árvores do gênero *Copaifera* spp.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Candidíase oral

2.1.1 - Definição, patogênese e fatores de risco

A candidíase é uma infecção fúngica comum da cavidade oral, provocada por leveduras do gênero *Candida* que podem existir tanto na forma comensal, quanto como patógenos oportunistas (LYNCH, 1994; AKPAN e MORGAN, 2002). Caracterizam-se por lesões frequentemente tratadas como condições inofensivas, mas que em muitas circunstâncias deveriam ser consideradas como uma doença grave, do ponto de vista diagnóstico, taxonômico e terapêutico (AXÉLL *et al.*, 1997).

Em um estudo que avaliou o microbioma da cavidade oral de pacientes saudáveis, as espécies de *Candida* foram as mais prevalentes (GHANNOUM *et al.*, 2010). Em condições de desequilíbrio e supercrescimento, a *C. albicans* é a espécie mais virulenta e mais comumente envolvida, representando cerca de 80% dos isolados de candidíase oral. Outras espécies de *Candida* não-*albicans* também já foram isoladas, dentre elas a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. A prevalência de cada espécie isolada varia de acordo com a localização geográfica e faixa etária dos grupos avaliados (MUADCHEINGKA e TANTIVITAYAKUL, 2015).

Os principais fatores de virulência que explicam a patogênese da *Candida* spp. e sua resistência antifúngica são seu dimorfismo, a sua capacidade de se adaptar e crescer em diversos habitats e de formar biofilme. A hidrofobicidade da superfície celular do fungo determina sua capacidade de adesão às células epiteliais bucais e às superfícies inertes de prótese dentárias, sendo formado o biofilme. A Figura 1 mostra as etapas que compreendem a formação do biofilme: 1) adesão do microrganismo a uma superfície; 2) organização celular e formação

discreta de colônias; 3) secreção de polímeros extracelulares e maturação; e 4) disseminação de células do biofilme (SENEVIRATNE e SAMARANAYAKE, 2008; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.* 2013).

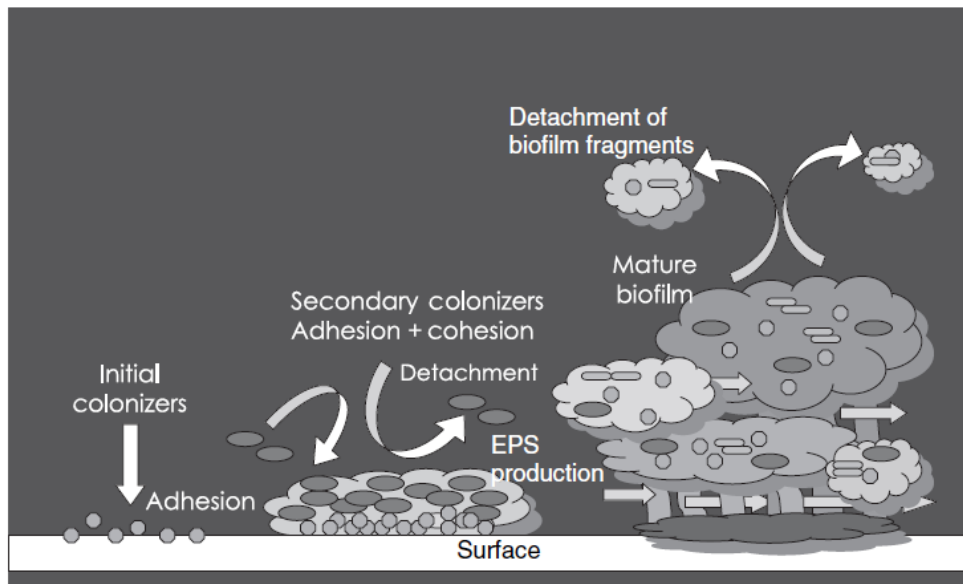


Figura 1 - Sequência de formação do biofilme da *Candida* spp. (Fonte: SENEVIRATNE e SAMARANAYAKE, 2008).

Em um estudo prévio, foi avaliada a cinética de formação de biofilme da *Candida* spp. por XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -Hidróxido de 5 - [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazólio). Isolados clínicos de adultos com fatores predisponentes locais (próteses removíveis) e sistêmicos (Diabetes *mellitus* tipo 2) foram avaliados. Encontrou-se que isolados orais de *C. glabrata* são produtores fortes de biofilme, enquanto que *C. albicans* e *C. tropicalis* são produtores moderados. Os autores concluem então que a formação de biofilme depende da espécie da *Candida* e da sua origem clínica (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013). Al-Karaawi *et al.* (2002) avaliaram 257 pacientes imunocompetentes e as espécies de leveduras orais de *Candida* spp. isoladas de 137 deles e concluíram que há subgrupos com predileção para certos pacientes e ambientes orais específicos.

Microorganismos capazes de formar biofilme muitas vezes causam infecções crônicas com alta tolerância a antifúngicos e resistência do sistema imunológico. Nesse ponto de vista, fármacos que inibem sua formação seriam potencialmente úteis no tratamento de infecções por *Candida* spp. (ZIDA *et al.*, 2017).

A candidíase oral afeta predominantemente idosos, bebês, usuários de próteses removíveis, pacientes em uso prolongado de antibióticos e/ou corticosteróides, submetidos à quimioterapia ou radioterapia de cabeça e pescoço, indivíduos com xerostomia e aqueles com alguma deficiência imunológica, como no caso da AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (World Health Organization, 2014).

A introdução da HAART (*highly active antiretroviral therapy*) no tratamento da AIDS diminuiu a incidência e gravidade de doenças oportunistas. Segundo Gonçalves *et al.* (2013), portadores de HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) não submetidos a esse tratamento são mais susceptíveis à manifestação de diferentes formas clínicas de candidíase oral. No entanto, mesmo com essa evolução, continua sendo uma doença comum desses pacientes decorrente a três fatores: resistência às drogas antifúngicas, formação natural de biofilme por *Candida* spp. e pela imunodeficiência acentuada dos pacientes (NITTAYANANTA, 2016).

2.1.2 - Aspectos clínicos

A candidíase apresenta-se de duas formas de acordo com seu aspecto clínico: branca e eritematosa. A candidíase oral branca inclui dois subtipos: candidíase pseudomembranosa e candidíase hiperplásica. Já a candidíase oral eritematosa inclui diversos aspectos clínicos: candidíase atrófica aguda, estomatite protética, glossite rombóide mediana, queilite angular e eritema gengival linear. Além disso, existem três formas de candidíase oral que não se encaixam nestas categorias clínicas: candidíase mucocutânea crônica, queilocandidíase e candidíase multifocal crônica. (MILLSOP e FAZEL, 2016).

Candidíase pseudomembranosa

A candidíase pseudomembranosa é a apresentação clássica da doença, caracterizada pela presença de placas brancas na língua, mucosa bucal, palato duro, palato mole e orofaringe. A pseudomembrana branca é facilmente removida com o auxílio de uma gaze, expondo uma superfície eritematosa. É formada pelo crescimento excessivo da levedura na mucosa oral, descamação celular e acúmulo de queratina, fibrina e restos necróticos de tecidos e fungos (Figura 2). São lesões tipicamente assintomáticas. No entanto, pacientes

sintomáticos queixam-se de ardência da boca, alterações do paladar, sabor amargo ou tendência para o sangramento fácil da região afetada. É uma doença mais comum em indivíduos imunossuprimidos como pacientes em uso de medicamentos imunossupressores e corticóides, transplantados de órgãos, portadores de neoplasias malignas e pacientes com HIV. Idosos e lactentes também são mais suscetíveis (FARAH, LYNCH e McCULLOUGH, 2010; MILLSOP e FAZEL, 2016).



Figura 2 – Candidíase pseudomembranosa em paciente fazendo uso de corticóide inalatório. Placas brancas removíveis em dorso de língua (A) e palato mole (B).

Candidíase atrófica aguda

A candidíase atrófica aguda apresenta-se como uma área eritematosa, mais comumente localizada no palato, mas também presentes na mucosa jugal e dorso de língua (Figura 3). Os pacientes geralmente queixam-se de queimação na boca e dor nos lábios e na língua. O uso prolongado de antibióticos de largo espectro é associado ao seu surgimento, pelo fato de favorecerem o supercrescimento de *C. albicans*, em decréscimo da flora bacteriana normal. Outros fatores predisponentes incluem o uso de corticosteróides, portadores de HIV, diabetes *mellitus*, anemia por deficiência de ferro e deficiência de vitamina B12 (FARAH, LYNCH e McCULLOUGH, 2010; MILLSOP e FAZEL, 2016).



Figura 3 – Candidíase atrófica aguda: área eritematosa em palato. (Foto cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Drumond Naves)

Estomatite protética

A estomatite protética ou candidíase atrófica crônica é encontrada em pacientes com próteses inapropriadas, mal higienizadas ou desadaptadas. São lesões eritematosas, edematosas e restritas à área de contato com as próteses (Figura 4). Geralmente é assintomática, mas os pacientes podem se queixar de queimação na boca. Seus sinais clínicos podem desde hemorragias petequiais pontuais e inflamação, até eritema e hiperplasia papilar da mucosa oral em contato com as próteses (FARAH, LYNCH e McCULLOUGH, 2010; MILLSOP e FAZEL, 2016).



Figura 4 - Estomatite protética. Área eritematosa restrita à área de contato de uma prótese parcial removível.

Glossite rombóide mediana

A glossite rombóide mediana é uma variante incomum da candidíase oral e apresenta-se como uma área de atrofia papilar central, eritematosa, localizada no centro da língua (Figura 05). Tipicamente, os pacientes são assintomáticos e está associada ao uso de corticosteróides inalatórios e tabagismo (FARAH, LYNCH e McCULLOUGH, 2010; MILLSOP e FAZEL, 2016).



Figura 5 - Glossite rombóide mediana: área eritematosa de atrofia papilar no centro da língua. (Imagem cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita)

Queilite angular

Apresenta-se como fissuras eritematosas ao longo das comissuras da boca, bilateralmente (Figura 6). Os pacientes queixam-se de dor local e os mais afetados são portadores de próteses com alteração da dimensão vertical de oclusão, bem como aqueles que lambem os lábios e os cantos de suas bocas frequentemente. Estas condições permitem um ambiente úmido, que favorece o supercrescimento da *C. albicans*. A queilite angular também pode ocorrer em pacientes com deficiências nutricionais de ácido fólico, ferro, riboflavina, tiamina e vitamina B12 (FARAH, LYNCH e McCULLOUGH, 2010; MILLSOP e FAZEL, 2016).



Figura 6- Queilite angular em paciente portadora de prótese total superior com alteração da dimensão vertical de oclusão.

2.1.3 - Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da candidíase é fundamentalmente clínico, por meio do exame objetivo, histórico e anamnese do paciente. No entanto, nenhum exame pode ser conclusivo de modo isolado. Em muitos casos são necessários testes microbiológicos para exclusão de outras condições como leucoplasia e líquén plano oral e em casos de resistência aos antifúngicos (CORONADO-CASTELLOTE e JIMÉNEZ-SORIANO, 2013; MARTY *et al.*, 2015).

Os principais métodos disponíveis são os exames de microscopia direta, cultura e testes genéticos como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Em alguns casos, a biópsia pode ser necessária, com destaque para a candidíase hiperplásica. O exame de microscopia direta do material obtido através da raspagem superficial das lesões não diferencia as espécies de *Candida spp.*, mas é uma alternativa simples e de baixo custo muito utilizada, com destaque para a coloração PAS (*Periodic acid–schiff*) (MARTY *et al.*, 2015).

O tratamento da candidíase oral deve incluir o diagnóstico precoce, correção dos fatores predisponentes e a manutenção de uma boa higiene oral. A escolha do antifúngico adequado deve ser baseada na extensão e gravidade da doença, considerando ainda, os

possíveis efeitos adversos dos medicamentos e interações medicamentosas. (GARCIA-CUESTA, SARRION-PÉREZ e BAGÁN, 2014; MILLSOP e FAZEL, 2016).

Os principais agentes antifúngicos tópicos são: violeta genciana, nistatina, anfotericina B e imidazóis como cetoconazol, clotrimazol e miconazol (Tabela 1). Antifúngicos sistêmicos incluem fluconazol oral, itraconazol e cetoconazol (Tabela 2) (GARCIA-CUESTA, SARRION-PÉREZ e BAGÁN, 2014; MILLSOP e FAZEL, 2016).

Tabela 1 - Principais agentes antifúngicos tópicos contra a candidíase oral.

| Agente | Veículo | Dose e frequência | Efeitos colaterais e outros aspectos |
|-------------------------|--|--|---|
| Violeta genciana | - Solução | - 1,5ml da solução a 0,5%, duas vezes ao dia. | - Irritação cutânea; - Úlceras orais; - Manchamento de roupas e pele. |
| Nistatina | - Creme/pomada; - Suspensão; - Pastilha. | - Creme/pomada: aplicar 3 a 4 vezes ao dia; - Suspensão: 100.000 UI, cinco vezes ao dia; - Pastilha: 100.000 UI, no máximo cinco vezes ao dia por 7-14 dias. | - Irritação cutânea; - Náuseas e vômitos. |
| Anfotericina B | - Creme/pomada; - Suspensão; - Loção. | - Creme/pomada: aplicar 3 a 4 vezes ao dia, por no máximo 14 dias; - Suspensão: 100mg/ml. | - Não é absorvida pelo intestino. |
| Miconazol | - Creme/pomada; - Gel. | - Creme/pomada/gel: 2%, 2 a 3 vezes ao dia por 2-3 semanas. | - Irritação cutânea; - Sensação de queimação. |
| Cetoconazol | - Creme. | - Creme: 2%, 2 a 3 vezes ao dia por 2-4 semanas. | - Irritação cutânea; - Dores de cabeça. |
| Clotrimazol | - Creme; - Solução. | - Creme: 1%, 2 a 3 vezes ao dia por 3-4 semanas; - Solução: 1%, 3 a 4 vezes ao dia por 2-3 semanas. | - Irritação cutânea; - Náuseas e vômitos. |

(Adaptado de MILLSOP e FAZEL, 2016).

Tabela 2 - Principais agentes antifúngicos sistêmicos via oral contra a candidíase oral.

| Agente | Veículo | Dose e frequência | Efeitos colaterais e outros aspectos |
|--------------------|--------------------------------|--|--|
| Cetoconazol | - Comprimidos. | - 200mg diariamente ou duas vezes ao dia por duas semanas. | - FDA (Food and Drug Association) não recomenda seu uso via oral; - Náuseas e vômitos; - Hepatotoxicidade; - Risco para grávidas; - Interações medicamentosas; - Perda de cabelo; - Insuficiência adrenal. |
| Fluconazol | - Cápsulas. | - Dose de ataque de 250g e 50-200mg diariamente depois disso por 7 a 14 dias. | - Distúrbios gastrointestinais; - Hepatotoxicidade; - Risco para grávidas; - Interações medicamentosas. |
| Itraconazol | - Cápsulas; - Solução oral. | - 100-200mg/dia por 14 dias; - Para casos severos, dose de ataque de 200mg três vezes ao dia por 03 dias. | - Tomar com alimentos e bebidas ácidas; - Risco para grávidas; - Distúrbios gastrointestinais; - Hepatotoxicidade; - Tonturas e dores de cabeça. |
| Posaconazol | - Suspensão. | - 100mg duas vezes ao dia no primeiro dia e depois um vez ao dia por 13 dias. - Casos refratários: 400mg duas vezes ao dia por 03 dias e depois uma a duas vezes ao dia por 25-28 dias. | - Distúrbios gastrointestinais; - Neutropenia; - Risco para grávidas. |

(Adaptado de MILLSOP e FAZEL, 2016).

Para pacientes com HIV/AIDS, a droga de primeira escolha é o fluconazol, por sua maior eficácia comparado a outros azóis. Para adultos, a posologia é de 100-150mg por dia, durante 07 a 14 dias ou em dose única, por ser mais conveniente. Em crianças a dose é de 3 mg/kg por 14 dias. Quando o fluconazol não estiver disponível ou contra-indicado, as alternativas são uso tópico de nistatina (suspensão ou pastilhas) ou clotrimazol. Além disso, o

uso profilático não é recomendado, pelo risco de resistência da *Candida* spp. aos antifúngicos (World Health Organization, 2014).

As lesões da candidíase oral são tipicamente assintomáticas, mas em pacientes sintomáticos, os principais problemas são ardor, disfagia, hemorragia, dor, halitose e boca seca (PATIL *et al.*, 2015). São lesões de bom prognóstico, mas que em alguns casos, podem ser a porta de entrada para casos mais severos como a candidíase esofágica e sistêmica. A candidemia é a complicação mais séria da doença e é caracterizada pela infecção pelo fungo na corrente sanguínea (DOI *et al.*, 2016).

Com a crescente incidência de espécies de *Candida* não-*albicans* e o desenvolvimento de resistência antifúngica, há uma exigência persistente na pesquisa de novos agentes antifúngicos (ANIBAL *et al.*, 2010; SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; PATIL *et al.*, 2015; ZIDA *et al.*, 2017). Nittayananta (2016) sugere que, para diminuir a resistência a drogas antifúngicas, os estudos sejam focados em extratos naturais de plantas com potencial antifúngico, capazes de combater o biofilme da *Candida* spp. e de aumentar a imunidade dos pacientes com candidíase oral.

Os produtos naturais são alternativas terapêuticas promissoras, já que possuem menos efeitos adversos e de menor intensidade quando comparados aos fármacos convencionais e podem ser alternativas viáveis e de baixo custo para o tratamento de doenças orais (VICENTE *et al.*, 2003; CORREIA *et al.*, 2016; FREIRES *et al.*, 2016).

2.2 - Própolis

2.2.1 - Definição e características

O termo própolis é derivado do grego *pro*, "em frente, entrada" e *polis*, "cidade ou comunidade". É uma substância natural coletada por abelhas em várias espécies de plantas e é utilizada na medicina popular há séculos. Trata-se de um material lipofílico, duro e quebradiço quando frio, mas macio, flexível e muito pegajoso quando quente. Possui odor característico, mostra propriedades adesivas de óleos e interagem fortemente com proteínas da pele. Sua composição é complexa e a cor varia dependendo da espécie de planta e da localização onde é produzida: savanas, florestas tropicais, desertos, regiões costeiras e montanhosas (BURDOCK, 1998; SANTOS, 2012).

Trata-se de um material resinoso coletado pelas abelhas de brotos e exsudados das plantas, misturado com enzimas de abelhas, pólen e cera. Uma das suas principais funções é proteger a colônia de doenças devido à suas propriedades antimicrobianas (SFORCIN, 2016).

Uma das suas propriedades é que mesmo congelada ou envelhecida, a própolis não apresenta alterações qualitativas na sua composição em relação às amostras frescas (SCHMIDT *et al.*, 2014; CONTI, BANKOVA e SFORCIN, 2015).

2.2.2 - Composição química e classificação

A composição química da própolis é complexa e diversas classes de compostos químicos já foram identificadas em sua estrutura: álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonóides, hidrocarboidratos, ésteres, éteres, ácidos graxos, cetonas, terpenóides, esteróides e açúcares. Mais de 300 substâncias químicas já foram descritos nos mais variados tipos de própolis e a sua proporção varia de acordo com a planta, o local e o período de coleta, além da espécie da abelha coletora (SANTOS, 2012; HUANG *et al.*, 2014).

De uma forma geral, a própolis *in natura* é composta por 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (BURDOCK, 1998).

A “própolis brasileira” é uma das principais própolis estudada devido a sua rica composição química e seu elevado valor terapêutico. Atualmente é classificada em 13 tipos. Park, Alencar e Aguiar (2002) a classificaram em 12 grupos com base nas suas características físico-químicas. As origens das plantas desses grupos foram investigadas utilizando -se RPHPLC (*Reversed-phase high-performance liquid chromatography*) e GC- MS (*gas chromatography-mass spectrometry*). Concluiu-se que as origens do grupo de própolis do sul, nordeste e sudeste são resinas de Álamo (*Poplar tree*), *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente (Figura 7). Os autores concluíram que a simples afirmação de que certa amostra corresponde à "própolis brasileira" dificilmente significa qualquer indicação de características físicas, químicas e biológicas, pois existe uma grande diversidade de tipos de própolis no Brasil, sendo necessário estudar sua composição.

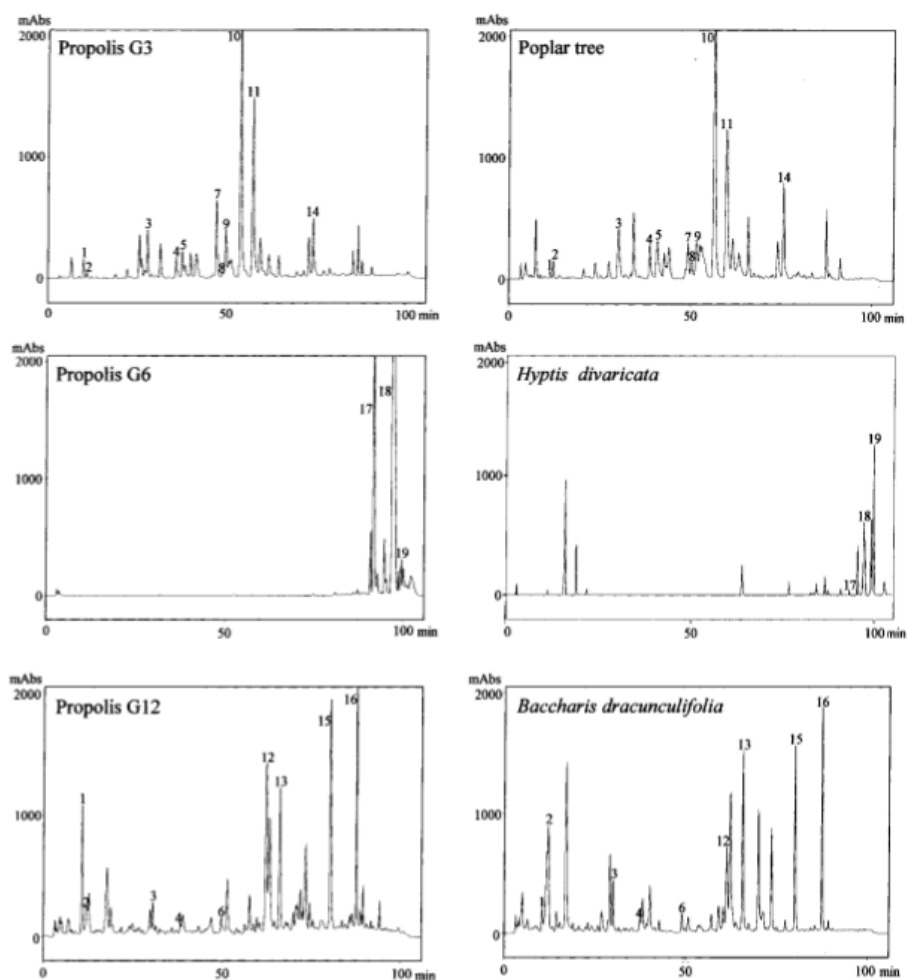


Figura 7 - Cromatogramas por RPHPLC dos extratos etanólicos de própolis tipos 3, 6 e 12 e resinas das plantas Álamo (*Poplar tree*), *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia* mostrando a semelhança dos seus perfis cromatográficos (Fonte: PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002).

Alencar *et al.* (2007) descreveram a composição química e atividade biológica de um novo tipo de própolis brasileira: a própolis vermelha, sendo considerada o tipo 13. A Figura 8 mostra o aspecto físico das amostras de própolis brutas verde e vermelha brasileiras (SANTOS, 2012).

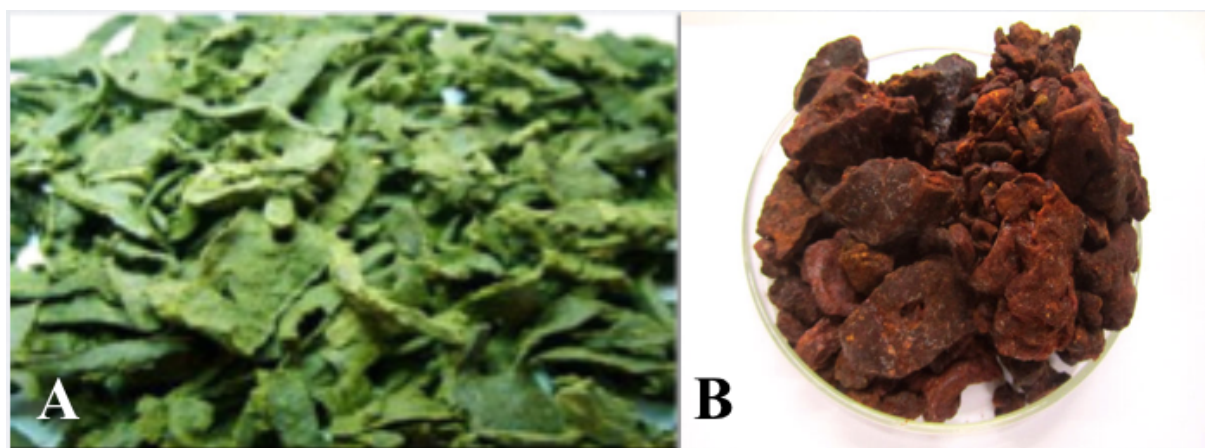


Figura 8 - Aspecto físico das amostras de própolis brutas verde (A) e vermelha (B) brasileiras. (Fonte: SANTOS, 2012).

De uma maneira geral, o maior grupo de compostos isolados da própolis são os compostos flavonóides, universais ao reino vegetal. Flavonóides isolados da própolis se correlacionam com os presentes nas plantas das quais as abelhas coletaram a própolis e é provável que, ocorra ainda alguma transformação da sua composição pela presença de enzimas na saliva das abelhas durante a coleta (BURDOCK, 1998). Os flavonóides contribuem para diversas atividades farmacológicas da própolis, (efeitos antibacterianos, antivirais e anti-inflamatórios) e sua quantidade é um critério da qualidade da própolis provenientes de regiões temperadas (HUANG *et al*, 2014).

Compostos fenólicos como ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e seus derivados são substâncias com características químicas com um papel antimicrobiano marcante, sobretudo na própolis verde brasileira, originada da *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) (TORETI *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014). Outro constituinte químico dominante da própolis verde brasileira é o Artepilim C, com propriedades antiinflamatórias (HUANG *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2016). Alguns compostos fenólicos e flavonóides típicos da própolis verde são representados na Figura 9.

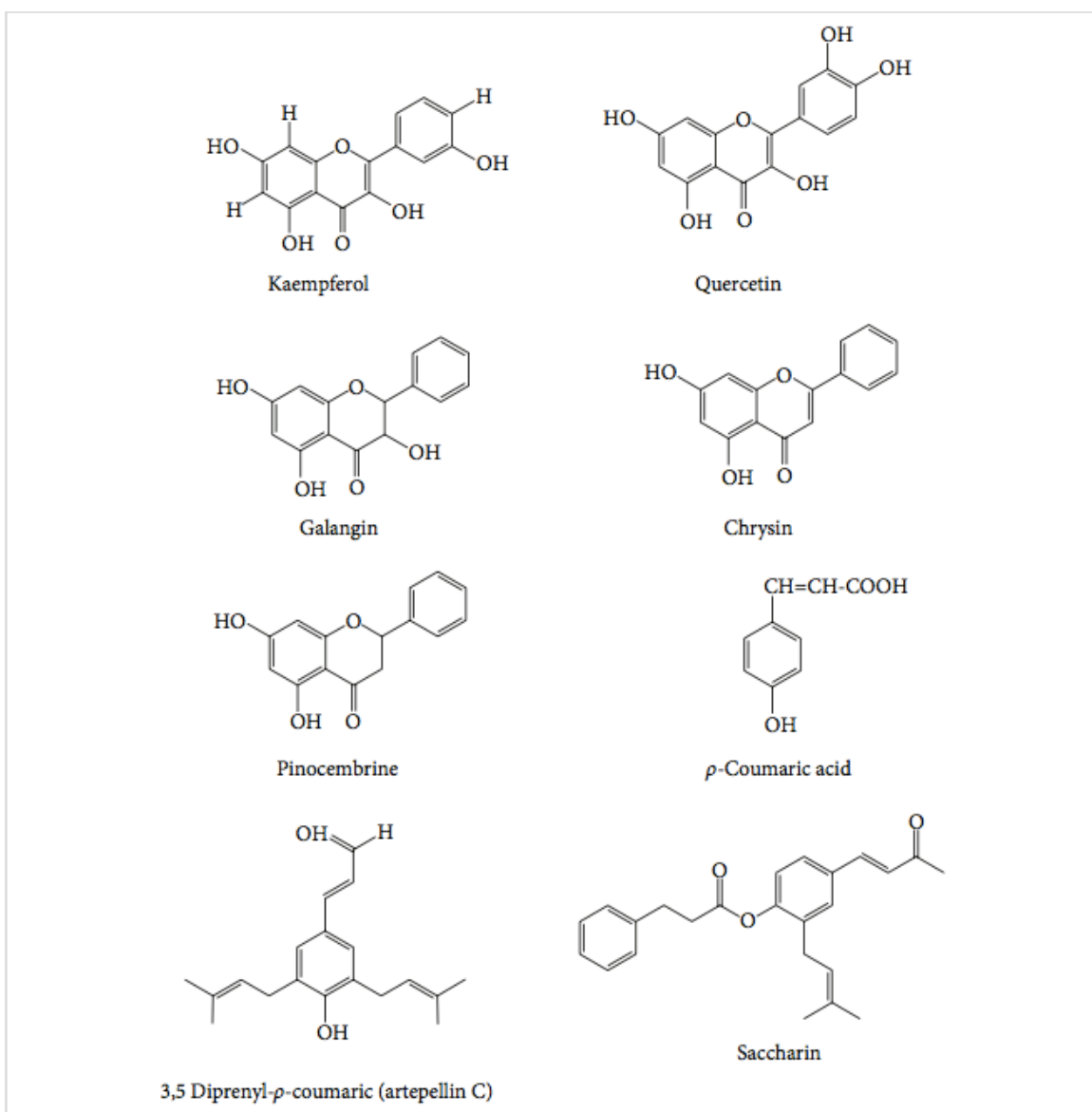


Figura 9 - Alguns compostos fenólicos e flavonóides típicos da própolis verde. (Fonte: TORETI *et al.*, 2013).

Existe uma grande controvérsia quanto à presença e abundância de flavonóides nas própolis brasileiras, em que os ácidos fenólicos geralmente são muito mais abundantes. Machado *et al.* (2016) avaliaram a composição química e atividades biológicas de oito amostras de própolis brasileiras (02 vermelhas, 03 verdes e 03 marrons) e concluíram que a concentração total de compostos fenólicos ou flavonóides não é o único fator responsável pelas propriedades antioxidantes. A natureza química dos compostos fenólicos e, talvez, a

presença de outros compostos contribuem para a capacidade antioxidante total dos extratos. Verificou-se que os extratos obtidos da própolis vermelha apresentaram o maior teor de compostos fenólicos e flavonóides, mas que a própolis verde foi a que mais apresentou atividades antioxidantes. Os extratos da própolis marrom apresentaram as menores quantidades de fenóis, flavonóides e conseqüentemente o menor potencial biológico.

Em outros países, exsudatos de brotos de diferentes espécies de árvores Álamo são a principal fonte de própolis em zona temperada, incluindo a Europa, Ásia e América do Norte. As amostras originárias destas regiões são caracterizadas por composição química semelhante: flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres. Na Rússia, a principal fonte vegetal de própolis é *Betula verrucosa* Ehrh., e suas principais substâncias biologicamente ativas são flavonóides (flavonas e flavonóis). Em Cuba e Venezuela, a *Clusia* spp. é a principal fonte vegetal e as benzofenonas polifeniladas são os principais componentes ativos (BANKOVA, 2005).

2.2.3 - Funções biológicas e aplicações terapêuticas

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de própolis no mundo (SANTOS, 2012) e atualmente já são conhecidas diversas das suas funções biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora e bioestimuladora (BURDOCK, 1998; BANKOVA, 2005; WHAG, 2013; SFORCIN, 2016).

Os benefícios desse produto natural despertaram o interesse global em desenvolver pesquisas e produtos, sobretudo no tratamento de doenças orais. O primeiro produto licenciado contendo própolis foi comercializado na Romênia em 1985 e na Odontologia, é utilizada em experimentos nas áreas de endodontia, cariologia, cirurgia oral, periodontia, patologia oral e no manejo de pacientes oncológicos (SANTOS, 2012).

Segundo Pereira *et al.* (2011), o uso de enxaguatório bucal contendo 5% de própolis verde brasileira para o controle da placa bacteriana e gengivite é eficaz, sugerindo que pode ser usada de forma terapêutica e preventiva no controle das doenças periodontais. Cairo do Amaral *et al.*(2006) também observaram os efeitos positivos da própolis no tratamento da gengivite e doença periodontal e de Luca *et al.* (2014), mostraram a efetividade de vernizes

dentários a base de própolis contra bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus casei*).

O poder antimicrobiano *in vitro* da Própolis Verde Brasileira, originada de *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim), foi demonstrado no estudo de Paula *et al.* (2006), num teste de susceptibilidade a 16 microrganismos patógenos orais, dentre eles fungos e bactérias: *Streptococcus mutans* (ATCC 70069), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Tanarella forsythensis* (ATCC 700191), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 25286), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33384), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 23726), *C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 2340) and *C. guilliermondii* (ATCC 201935). Todos foram susceptíveis. Esse trabalho ainda testou a eficácia dos constituintes da própolis separadamente e concluiu que o efeito sinérgico dos mesmos é maior do que seu uso isolado.

Akca *et al.* (2016) compararam a eficiência antimicrobiana do extrato etanólico de própolis (EEP) proveniente da Turquia com o gluconato de clorexidina (CHX) contra amostras de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC33478), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC4356), *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* (ATCC11741), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC), *Actinomyces israelii* (ATCC12102), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC25611), e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os resultados deste estudo sugerem a que a própolis pode ser tão eficaz quanto CHX contra microrganismos orais em seu estado de biofilme e que embora a CHX seja um dos produtos de enxágüe oral mais comuns contra uma vasta gama de microrganismos, o EEP pode servir como um enxaguante bucal antimicrobiano natural e confiável, de modo a evitar os efeitos colaterais da CHX. Estudos *in vivo* são requeridos para descobrir o mecanismo efetivo da própolis e sua dose de administração apropriada.

A atividade antifúngica *in vitro* da Própolis Verde Brasileira contra *Candida albicans* já foi demonstrada por Martins *et al.* (2002), onde doze amostras coletadas de pacientes com candidíase oral e HIV-positivos foram susceptíveis ao extrato. Mello *et al.*(2006), avaliaram a

formação do tubo germinativo de *C.albicans* após sua exposição à própolis em diferentes concentrações. Os autores sugeriram que a atividade antifúngica da própolis parece estar relacionada a um aumento de volume e ruptura da parede e da membrana celulares. Os resultados positivos apontam a própolis como uma terapia alternativa para doenças infecciosas da cavidade oral, como a candidíase. Santos *et al.* (2005, 2008), Capistrano *et al.* (2013) e Pina *et al.* (2017) demonstraram, *in vivo*, que a a própolis verde brasileira é uma alternativa no tratamento de pacientes com estomatite protética por *Candida* spp., possuindo um efeito similar ao miconazol.

Devido à enorme variedade de própolis existentes no mundo, Kujumgiev *et al.* (1999) avaliaram e compararam a composição química, atividade antibacteriana e antifúngica de amostras de própolis (extratos etanólicos e óleos voláteis) de diferentes localidades nos trópicos e nas zona temperadas. Foram coletadas amostras nas seguintes localidades: Bulgária (01); Albânia (01); Mongólia (01); Egípto (01); Ilhas Canárias (02); Brasil (06). No Brasil, as amostras foram coletadas nas regiões de Rio Claro-SP, Limerá-SP, Prudentópolis-PR, Pacajus-CE, Picos-PI e novamente Prudentópolis-PR, sendo as últimas duas produzidas por abelhas indígenas sem ferrão do gênero *Melipona*. Os autores concluíram que, apesar das grandes diferenças na composição química da própolis de diferentes locais geográficos, todas as amostras exibiram atividade antibacteriana e antifúngica significativas. Não é possível apontar uma substância individual ou uma determinada classe de substância que possa ser responsável por essa ação. Trata-se de uma mistura natural e uma fonte de novos e poderosos compostos antimicrobianos individuais.

2.3 - Copaíba

As copaibeiras ou paus d'óleo são árvores comuns na América Latina e África Ocidental. No Brasil, são encontradas mais de 16 espécies nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e principalmente Amazônica. Crescem também no nordeste da Argentina, sul da Bolívia e norte do Paraguai. Atingem altura entre 25 e 40 metros, diâmetro entre 0,4 e 4 metros, possuem casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem. As sementes (Figura 10) são pretas e ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos (PIERI; MUSSI e MOREIRA, 2009; GONELA *et al.*, 2013).



Figura 10 - Semente de *Copaifera* spp. (Fonte: <http://ibflorestas.org.br/loja/sementes/semente-copaiba.html>).

O extrato de óleo-resina ou do óleo de copaíba (bálsamo de copaíba) obtido através de pequenos cortes na casca do caule da planta possui inúmeras aplicações na indústria e na medicina/odontologia. Pode ser usado como forma de combustível, são úteis na fabricação de perfumes, cosméticos, solventes e vernizes e podem ser adicionados na formulação de alimentos aprovados pelo FDA (*Food and Drugs Administration*). Além disso, apresenta uma gama enorme de utilizações na medicina popular, indígena e na indústria farmacêutica (PIERI; MUSSI e MOREIRA, 2009). Além do óleo dos troncos, Stupp *et al.*(2008) também destacaram que os componentes das sementes possuem potencial como ingrediente cosmético ou farmacêutico.

A composição química do óleo de copaíba é uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos e seu efeito farmacológico não pode ser atribuído a apenas um componente, porque os componentes podem interagir sinergicamente na promoção da atividade observada. Os principais sesquiterpenos contituíntes do óleo-resina são: beta-cariofileno, óxido de

cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cadinol, α -cubebene, α - e β -selineno, β -elemeno, α -copaeno, -Trans- α bergamoteno, e β -bisaboleno. Já os diterpenos mais comumente encontrados são: copálico, polyalthic, hardwickiic, caurenóico e ácidos ent-caurenóico, juntamente com os seus derivados de 3-hidroxi-copálico, 3-acetoxi-copálico e ent-agathic (LEANDRO *et al.*, 2012). Para alguns autores, a originalidade do óleo deve ser confirmada pela presença do ácido copálico (PIERI; MUSSI e MOREIRA, 2009).

O óleo-resina de copaíba é amplamente utilizado como medicamento pela população, tanto na forma tópica, como oral. Dentre as aplicações estão: bronquite e asma, dores e ferimentos em geral, psoríase e gonorréia. Além disso, é usado como anti-séptico para feridas e úlceras de pele, corrimento vaginal, inflamação de garganta, infecções uterinas, câncer e leishmaniose. Das várias indicações terapêuticas, algumas já foram confirmadas por diversos autores: anti-inflamatória, cicatrização de feridas, antimicrobiana, leishmanicida, larvicida, antineoplásica e anestésica (LEANDRO *et al.*, 2012).

Abraão *et al.* (2015), avaliaram as atividades antibacterianas e citotóxicas do óleo-resina de *C. langsdorffii* e seus compostos isolados, concluindo que dentre os compostos testados, os diterpenos demonstraram ter potencial para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes.

Pieri *et al.* (2012), Bardají *et al.* (2016) e Simões *et al.* (2016) destacam o potencial antimicrobiano *in vitro* do óleo de copaíba contra os principais patógenos orais envolvidos com a doença periodontal e a cárie, com a perspectiva de que formulações farmacêuticas sejam aplicadas no controle do biofilme.

Deus *et al.*, (2009) e Deus, Alves e Arruda (2011) avaliaram a ação antifúngica *in vitro* da espécie de copaíba *C. multijuga* Hayne e concluíram que seu óleo apresenta bom potencial de ação antimicrobiana contra microorganismos dos gêneros *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., podendo ser um bom indicativo para estudos mais específicos no combate à candidose e aspergilose.

3 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Verificar a citotoxicidade e as atividades antifúngicas da própolis de copaíba (*Copaifera* spp.) e de um protótipo de enxaguante bucal desta própolis contra espécies de leveduras do gênero *Candida* spp.

3.2 – Objetivos específicos

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato hidroetanólico da própolis de copaíba para microorganismos do gênero *Candida* spp;
- b) Verificar a atividade antifúngica do extrato hidroetanólico da própolis de copaíba contra espécies do gênero *Candida* spp.;
- c) Verificar a atividade antifúngica de um enxaguante bucal contendo própolis de copaíba, desenvolvido para esta pesquisa, sobre as espécies do gênero *Candida* spp.;
- d) Verificar a citotoxicidade *in vitro* do extrato hidroetanólico da própolis de copaíba.

4 - METODOLOGIA

4.1 - Própolis

A própolis de copaíba (PC), foi assim nomeada com base na origem botânica predominante na região de sua coleta, de árvores do gênero *Copaifera* spp. As abelhas coletoras foram atestadas da espécie *Apis mellifera*. As amostras da própolis foram oriundas de cidades do oeste de Minas Gerais, Brasil e fornecidas pela empresa PharmaNéctar Ltda. (Belo Horizonte, Brasil). O extrato de própolis hidroetanólico a 25% utilizado neste estudo foi extraído pela mesma empresa. As amostras de própolis bruta (Figura 11) foram desidratadas com uma bomba de baixo vácuo e os extratos da própolis seca foram preparados como descrito por Park *et al.* (1998), com modificações. As amostras de própolis bruta foram trituradas em pó fino e misturados com etanol aquoso a 80% num tubo de ensaio e agitados a 70 ° C durante 30 min. Após extração, a mistura foi centrifugada a 8.000 rpm para se obter os sobrenadantes.

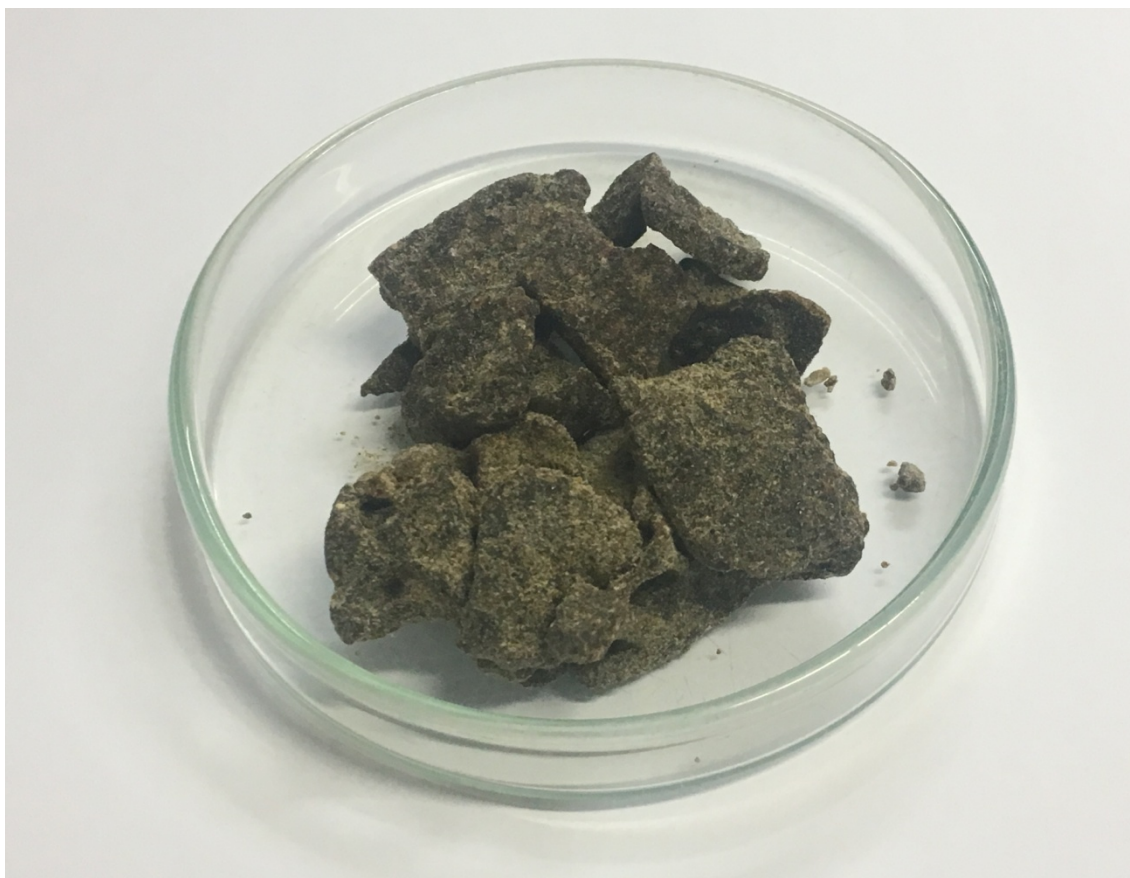


Figura 11 - Amostra da própolis de copaíba bruta.

4.2 – Perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-UV/DAD)

O perfil cromatográfico do extrato de própolis foi realizada por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência em Fase Reversa (termo em inglês *Reverse-phase ultra performance liquid chromatography* - RP-UPLC), no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, com a colaboração da Professora Rachel Oliveira Castilho. Utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC® (*Acquity System® Waters*), acoplado a detector UV/DAD, Coluna *Acquity UPLC® BEH C18* (100 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm) e Pré-coluna *VanGuard™ C18* (2,1 x 5 mm, 1,7 µm). A temperatura do forno foi de 30 °C. Utilizou-se gradiente linear com fase móvel composta de água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico grau CLAE, conforme descrito na Tabela 3. O fluxo utilizado foi de 0,3 mL/ min e comprimentos de onda de detecção foram de 210 e 335 nm. O volume de injeção foi de 2,0 µL.

Tabela 3 - Gradiente de eluição empregado na obtenção do perfil exploratórios por UPLC-UV/DAD para o extrato de própolis.

| Tempo(minutos) | H ₂ O (%) | ACN (%) |
|----------------|----------------------|---------|
| 0 | 95 | 5 |
| 24 | 5 | 95 |
| 26 | 5 | 95 |
| 28 | 95 | 5 |
| 30 | 95 | 5 |

4.2.1 - Preparo das amostras

Dissolveram-se exatamente 50 µL do extrato de própolis em 950 µL de metanol grau CLAE. O extrato foi solubilizado com auxílio de ultrassom por 20 minutos e, em seguida, centrifugado a 9184g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa com membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) de 0,22 µm para *vials* de 2 mL.

4.2.2 - Comparação com padrões de referência

Analisou-se por UPLC-UV/DAD, em uma mesma corrida cromatográfica, solução do extrato de própolis, soluções de padrões de ácido caféico, ácido ferúlico, apigenina, canferol e quercetina isoladamente preparadas. O extrato foi preparado conforme descrito no item 4.2.1 e os padrões foram solubilizados em metanol resultando em concentração aproximada de 1 mg/mL.

4.3 - Enxaguante bucal

O protótipo de enxaguante bucal (Figura 12) foi produzido de acordo com o trabalho de Zanin *et al.* (2007), com modificações. Foram misturados em benzoato de sódio, EDTA dissódico, poloxâmero 407, propilenoglicol e adicionado água deionizada suficiente para solubilização destes componentes da mistura. Em seguida foi adicionado o extrato hidroetanólico da própolis, de modo que sua concentração final fosse 10%. Finalmente, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio a 20% até 6,3. Uma formulação sem extrato de própolis de copaíba (EPC) também foi realizada para controle negativo nos testes.



Figura 12 - Aspecto do protótipo de enxaguante bucal a base de própolis de copaíba a 10%.

4.4 - Microorganismos

Os microorganismos testados foram *Candida albicans* - ATCC 18804 (gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), *Candida tropicalis* -HIC 3M.8 e *Candida krusei* -EIA 3M.6 (gentilmente cedida pelo prof. Carlos Augusto Rosa, Laboratório de Microbiologia do ICB - Instituto de Ciências Biológicas/ UFMG). As amostras foram conservadas em freezer a -20°C até o momento do uso. Os microorganismos foram suspensos em caldo Sabouraud dextrosado (Himedia, Índia) e cultivados durante 24 horas, em ambiente de aerobiose e em estufa bacteriológica a 35° C.

Para diferenciação dos fungos foi utilizado o CHROMagar *Candida*® Medium (Difco, USA), um meio seletivo para o isolamento das espécies de *Candida*, através da inclusão de substratos cromogênicos na sua composição. Nesse método, as colônias de *C. albicans* aparecem numa coloração verde-claro, as colônias de *C. tropicalis* de azul esverdeado a azul metalizado e as colônias de *C. krusei* aparecem com um tom cor-de-rosa claro com um rebordo esbranquiçado (ODDS e BERNAERTS, 1994; PFALLER, HUSTON e COFFMAN, 1996).

O preparo dos inóculos foi feito de acordo com a Norma M27-A2 da NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)/CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*), seguida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (NCCLS, 2002). Foi realizada uma subcultura dos organismos, em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose, meio utilizado para isolamento, identificação e conservação de fungos patogênicos. A temperatura de incubação foi 35° C.

Os inóculos foram preparados escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de ~1mm de cultura de 24 horas para espécies de *Candida*, sendo suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%). As suspensões resultantes foram colocadas em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 (Padrão de turbidez de Sulfato de Bário McFarland 0,5). Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1 a 5 x 10⁶ UFC/mL. As

suspensões de trabalho foram produzidas fazendo-se uma diluição 1:10 em caldo Sabouraud dextrosado, resultando em concentração de 1 a 5×10^5 UFC/mL.

4.5 – Testes de susceptibilidade antifúngica

4.5.1 - Microdiluição em caldo

O método utilizado foi o ensaio de microdiluição em caldo conforme a Norma M27-A2 da NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)/CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*), seguida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (NCCLS, 2002), por sua reprodutibilidade e sensibilidade, além de requerer pequenas quantidades de amostra e poder ser usado para grande número de amostras (OSTROSKY *et al.*, 2008). Foram testados, em triplicata, o extrato de própolis de copaíba (EPC) e o seu protótipo de enxaguante bucal. A Nistatina a 100.000UI (Neo Química Ltda, Brasil) serviu de controle positivo e meio de cultura puro e uma formulação do enxaguante bucal sem EPC (branco) serviram como controles negativos da inibição.

Em placas de microtitulação de 96 poços, foram adicionados 100µL do meio de cultura Agar Sabouraud dextrosado em cada poço, exceto na coluna 01 (adição do extrato de própolis de copaíba - EPC), da coluna 10 (adição de 100 µL do controle positivo de Nistatina), da coluna 11 (adição de 100 µL do enxaguante de própolis de copaíba a 10%) e da coluna 12 (adição de 100 µL do enxaguante branco, sem a presença de própolis). Nos poços da coluna 01 foram adicionados 200µL do EPC e a partir deles foram realizadas diluições seriadas com a utilização de uma pipeta automática multicanal, coletando 100 µL da coluna 1 até os poços da coluna 8, dos quais foram removidos 100 µL após a diluição. Dessa forma, os poços da coluna de 1 a 8 ficaram com 100 µL da solução de extrato de própolis de copaíba com concentração variando de 2500µg/ml a 19,5 µg/ml (Figura 13).

Após cada poço estar preenchido com 100µl das soluções, foram adicionados 100µl da solução de trabalho com inóculos das três espécies de *Candida* spp. Dessa forma, totalizou-se um volume final em cada poço de 200µl e concentração final da própolis de copaíba nos poços de 1 a 8 de 1250µg/ml a 9,76 µg/ml e do protótipo de enxaguante bucal a 5%. As placas foram incubadas por 18 horas a 35°C.

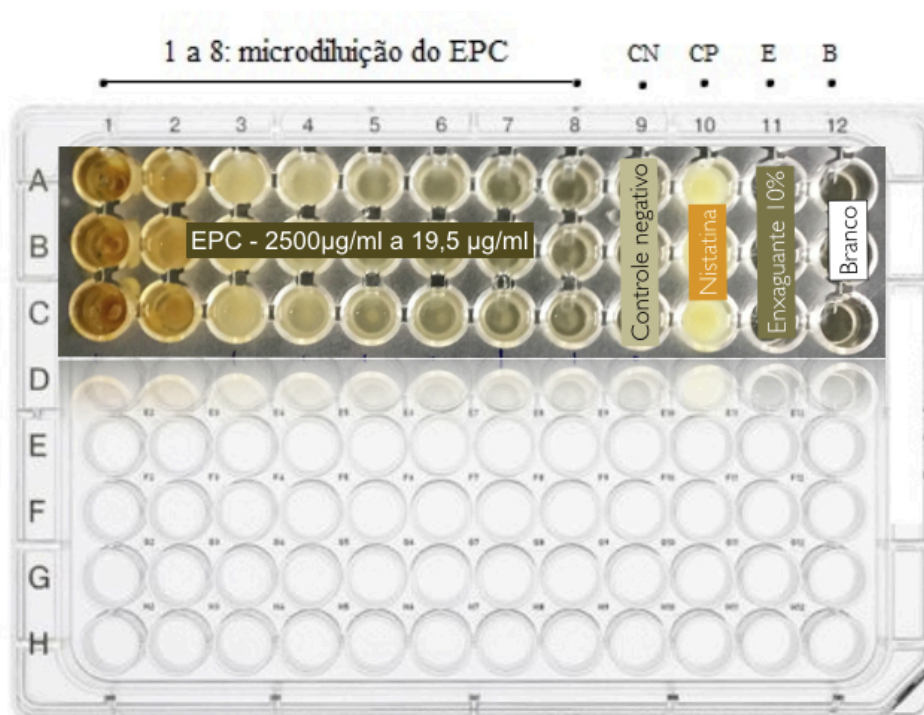


Figura 13 - Esquema de microdiluição em caldo. Poços de 1 a 8: microdiluição do EPC; poços 9: controle negativo (CN)- meio de cultura puro; poços 10: controle positivo (CP) - Nistatina); poços 11: protótipo de enxaguante bucal com PC (E); poços 12: protótipo de enxaguante bucal sem PC (branco- B).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração na qual ocorresse 100% de inibição de crescimento das espécies de *Candida* spp. testada. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi considerada a menor concentração do composto em que não houvesse crescimento celular sobre a superfície de ágar inoculado, ou seja, 99,9% de morte da levedura. Para isso, cada solução contida nos poços foi diluída de forma seriada e plaqueada, para contagem celular. Em três poços consecutivos foram adicionados 80 µl de caldo Sabouraud dextrose. A partir da linha 1 foram realizadas diluições seriadas, com a utilização de uma pipeta automática multicanal, adicionando-se 20 µl nos poços e transferindo em seguida outros 20 µl para os poços da linha 2 e depois para a linha 3, dos quais após a diluição foram removidos 20µl. Dessa forma, obteve-se soluções diluídas 10x, 100x e 1000x de cada poço e em seguida plaqueadas para contagem celular.

4.5.2 - Difusão em ágar

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS ((*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (OSTROSKY *et al.*,2008). O método utilizado foi o teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão conforme as normas CLSI, M2-A8, Vol. 23 No1 (NCCLS, 2003) com pequenas modificações.

As três espécies de *Candida* spp. foram testadas em triplicata. Os inóculos foram devidamente preparados como descrito anteriormente e 500µl foram semeados em placas de 100mm, esfregando com um *swab* em toda a superfície estéril do ágar Sabouraud dextrosado, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. A tampa foi deixada entreaberta de três a cinco minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de se aplicar os discos impregnados de droga. Discos brancos (Laborclin Ltda, Brasil) estéreis de 6mm foram distribuídos por igual na superfície da placa de ágar semeada, sendo pressionados de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. Em seguida foram embebidos em 20 µl com extrato de própolis de copaíba (EPC) e o seu protótipo de enxaguante bucal. A Nistatina a 100.000UI (Neo Química Ltda, Brasil) serviu de controle positivo e água destilada estéril e uma formulação do enxaguante bucal sem EPC serviram como controles negativos da inibição.

A leitura dos resultados foi realizada após 24horas de incubação a 35° C, quando os diâmetros das zonas de inibição foram medidos e comparados. Os diâmetros das zonas de inibição foram relatados como Médias + Desvio Padrão (M ± DP).

4.6 - Teste de citotoxicidade

Foram realizados testes *in vitro*, utilizando fibroblastos 3T3- L1. A linha de 3T3- L1 foi adquirida diretamente do Banco de Células de Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram semeadas numa densidade inicial de 2500 células/cm² em garrafas de cultura T25, contendo 7 mL de meio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com alto teor de glicose (4,5 g/L) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico/antimicótico (100U de penicilina, 100µg de estreptomicina) e bicarbonato de sódio (13,7g/L).

As células foram mantidas nas seguintes condições: temperatura de 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada dois dias. Após atingir confluência, elas foram transferidas para placas de 96 poços com concentração em torno de 1×10^5 células/poço para fazer os testes.

4.6.1 - Ensaio de MTT em fibroblastos 3T3 – L1

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular indiretamente através da atividade enzimática das enzimas mitocondriais redutases. Esse teste se baseia na formação de cristais azuis de formazam produzidos através do processo de oxidação do reagente de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue, íon tetrazólio) por essas enzimas. Assim, a viabilidade celular pode ser identificada e quantificada pela formação e concentração dos cristais azuis, que indicam atividade mitocondrial ou presença de células vivas.

Os testes foram realizados após 70% de confluência das células, na qual foram adicionados em cada poço diferentes concentrações do extrato de própolis em seis replicatas (as concentrações testadas foram entre 15µg/ml e 4000µg/ml). O tempo de contato (incubação) foi de 24 e 48 horas à temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂.

Após incubação e lavagem com solução de PBS (*Phosphate buffered saline*) estéril, o reagente de MTT (Sigma, USA) foi adicionado nas placas, sendo essas protegidas da luz devido à fotossensibilidade desse reagente. Depois de 4 horas de incubação à 37°C para formação dos cristais azuis de formazam, foi adicionado uma solução detergente de dodecilsulfato de sódio (SDS). Então ao completar 18 horas, foram realizado as leituras em Espectrofotômetro de UV-Visível no comprimento de onda de 570 nm. Os respectivos controles negativos (contendo somente células sem tratamento) e brancos (sem células e sem tratamento, contendo todas as soluções envolvidas no teste) foram analisados em todas as placas.

A análise estatística foi realizada pelo software *Graphpad Prism*®, utilizando o teste ANOVA para comparação entre os tratamentos e o teste de Bonferroni para suas comparações múltiplas.

5 - RESULTADOS

5.1 - Perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-UV/DAD)

A análise do perfil cromatográfico do Extrato de própolis de copaíba (EPC) mostrou a maior parte dos picos, incluindo os picos majoritários, em tempo de retenção entre 0 e 18 minutos, indicando que o mesmo possui média a alta polaridade, sendo constituído principalmente por substâncias polares (Figuras 14 e 15).



Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-UV/DAD para o extrato etanólico de PC em comprimento de onda de detecção de 210 nm.

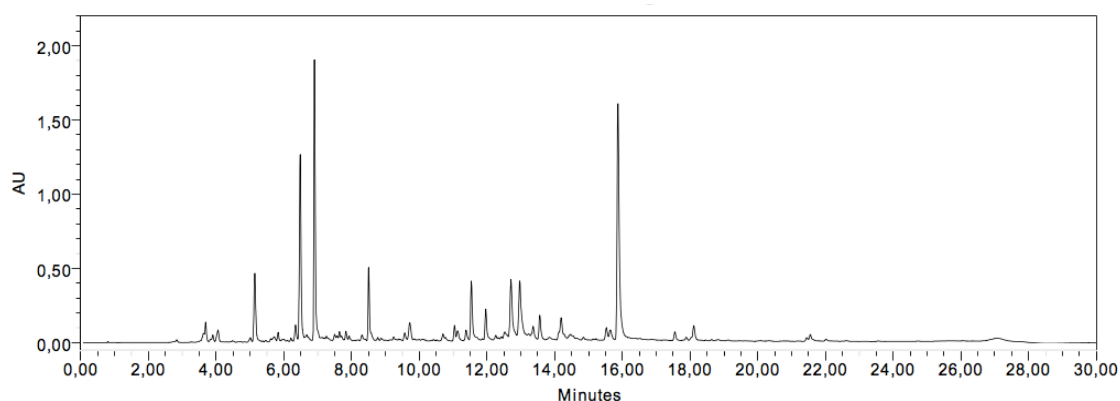


Figura 15 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-UV/DAD para o extrato etanólico de PC em comprimento de onda de detecção de 335 nm.

Foram identificados compostos fenólicos, dentre esses compostos flavonóides. Foi possível identificá-los pelo espectro de ultravioleta (UV) que apresentou dois grandes cromóforos, um em comprimento de onda de aproximadamente 250 nm e outro em 350 nm. A Figura 16, representa o espectro de UV do pico 7, eluído em tempo de retenção de 5,830 min., característico de um flavonóide.

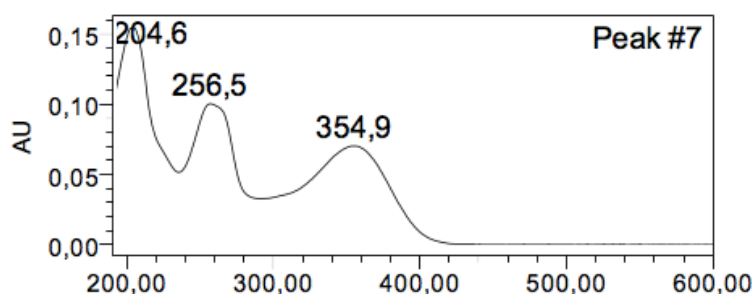


Figura 16- Espectro de ultravioleta para o pico eluído em tempo de retenção de 5,830 min, obtidos on line no UPLC UV/DAD para o extrato etanólico de própolis de copaíba.

Os picos com tempo de retenção 6,209 min (pico 9), 9,568 min (pico 24) 12,709 min (pico 35) e 12,968 min (pico 36) também apresentaram espectros de UV com mesmo perfil de absorção, sendo um indício da presença de flavonóides no extrato de própolis de copaíba. Quando comparado com a solução padrão, foi possível identificar o flavonóide canferol. A Figura 17 mostra a comparação do espectro de ultravioleta para o pico eluído em tempo de retenção de 9,568 min. com o espectro ultravioleta da solução de canferol padronizada.

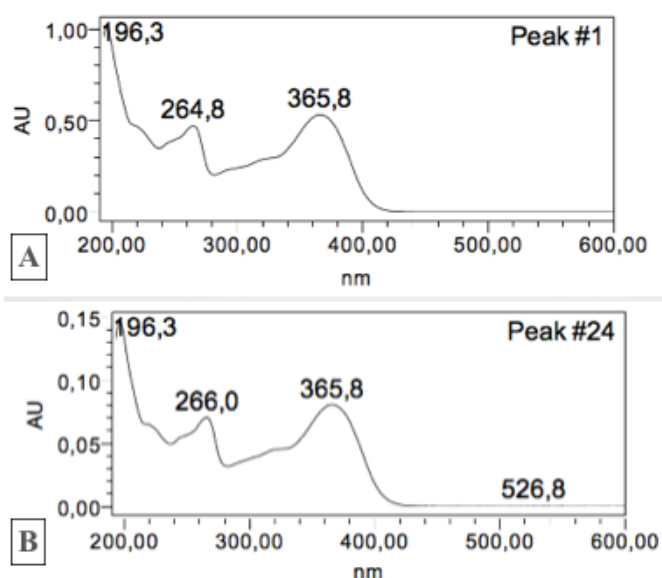


Figura 17- A: Espectro de ultravioleta para da solução de canferol padronizada. B: pico eluído em tempo de retenção de 9,568 min para o extrato etanólico de própolis de copaíba.

Dentre os ácidos fenólicos encontrados (picos 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 20 e 44), foi possível a identificação do ácido caféico. A Figura 18 mostra a comparação do espectro de ultravioleta para o pico eluído em tempo de retenção de 4,055 min. com o espectro ultravioleta da solução de ácido caféico padronizada.

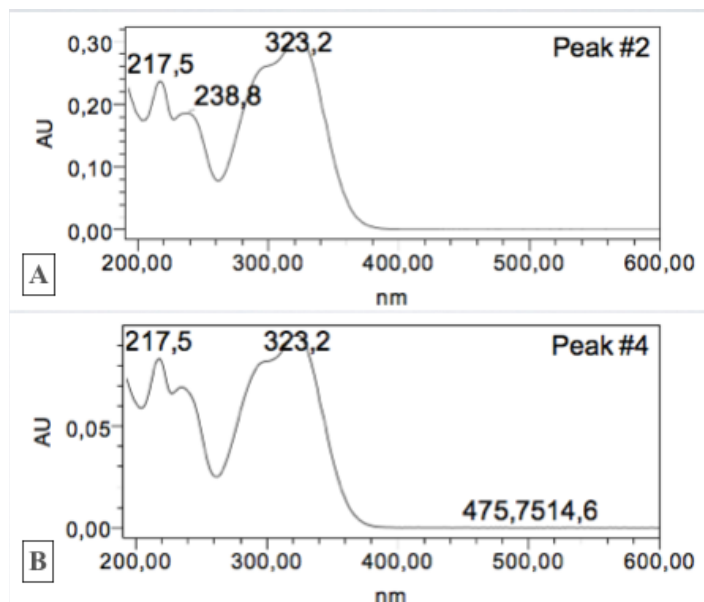


Figura 18- A: Espectro de ultravioleta para da solução de ácido caféico padronizada. B: pico eluído em tempo de retenção de 4,055 min para o extrato etanólico de própolis de copaíba.

5.2 - Susceptibilidade antifúngica

Inicialmente, as amostras de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram diferenciadas pela utilização do CHROMagar Candida Medium (Figura 19). As colônias de *C. albicans* apresentaram uma coloração verde-claro, as colônias de *C. tropicalis* coloração azul metalizado e as colônias de *C. krusei* aparecem com um tom cor-de-rosa claro com um rebordo esbranquiçado.

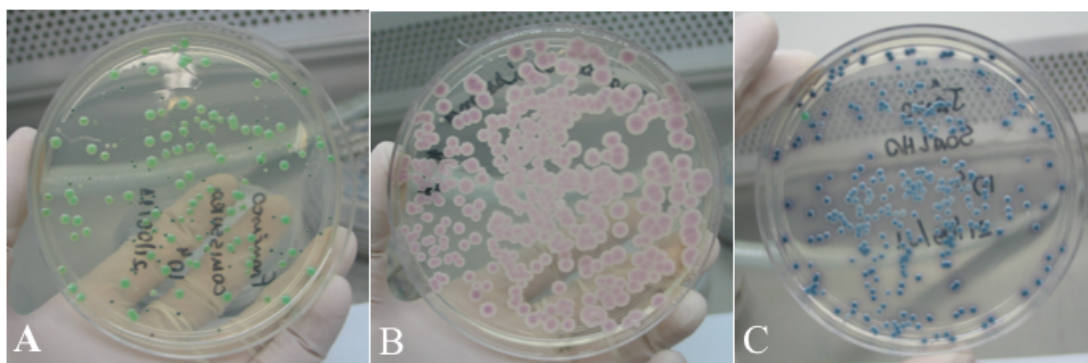


Figura 19 - Coloração das colônias pelo método do CHROMagar Candida Medium. **A-** *C. albicans*: coloração verde-claro; **B-** *C. krusei*: coloração cor-de-rosa claro. **C-** *C. tropicalis*: coloração azul metalizado.

Os resultados da microdiluição em caldo para determinar o potencial antifúngico do EPC estão demonstrados na Tabela 4. Devido à turbidez do extrato da própolis estudada, não foi possível diferenciar em quais dos poços não houve crescimento das leveduras visível, sendo necessário seu plaqueamento em ágar. Sendo assim, os valores de CIM e CFM foram as menores concentrações do extrato capazes de inibir o crescimento microbiano, variando de acordo com a espécie de *Candida* spp. Além de analisar o EPC, foi possível verificar que o protótipo de enxaguante bucal também inibiu o crescimento das três espécies de *Candida* spp., sendo comprovado seu efeito antifúngico, também na concentração de 5%.

Tabela 4 -Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do EPC contra *Candida* spp.

| | CIM | CFM |
|---------------------------|-----------|-----------|
| <i>Candida albicans</i> | 156 µg/ml | 156 µg/ml |
| <i>Candida tropicalis</i> | 312 µg/ml | 312 µg/ml |
| <i>Candida krusei</i> | 625 µg/ml | 625 µg/ml |

As médias e desvio padrão ($M \pm DP$) das zonas de inibição do diâmetro obtidas no teste de difusão em ágar utilizando o EPC, o protótipo de enxaguante bucal e Nistatina contra *Candida* spp. estão na Tabela 5. Um detalhe importante foi a presença de colônias resistentes

no interior de alguns halos de inibição. Os discos com água destilada e enxaguante bucal sem PC não apresentaram atividade antifúngica.

Tabela 5 - Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) das zonas de inibição do diâmetro obtidas no teste de difusão em ágar utilizando o EPC a 25% e protótipo de enxaguante bucal a 10% contra *Candida* spp.

| | Zonas de inibição em mm (médias \pm DP) Extrato da própolis de copaíba a 25% | Zonas de inibição em mm (médias \pm DP) - Enxaguante da própolis de copaíba a 10% | Zonas de inibição em mm (médias \pm DP) - Nistatina 100.000 ui |
|----------------------|--|---|--|
| <i>C. albicans</i> | 10,31* \pm 1,52 | 11,67* \pm 1,52 | 13,00 \pm 1,00 |
| <i>C. tropicalis</i> | 16,67* \pm 2,08 | 11,50* \pm 0,70 | 14,50 \pm 0,70 |
| <i>C. krusei</i> | 15,67* \pm 1,15 | 9,00* \pm 1,73 | 14,00 \pm 1,73 |

* presença de colônias resistentes nos halos de inibição.

5.3 - Citotoxicidade

Os resultados obtidos do teste viabilidade celular *in vitro* do extrato de própolis em baixas concentrações pelo método de MTT com 24 h e 48 h estão apresentados na Figura 20.

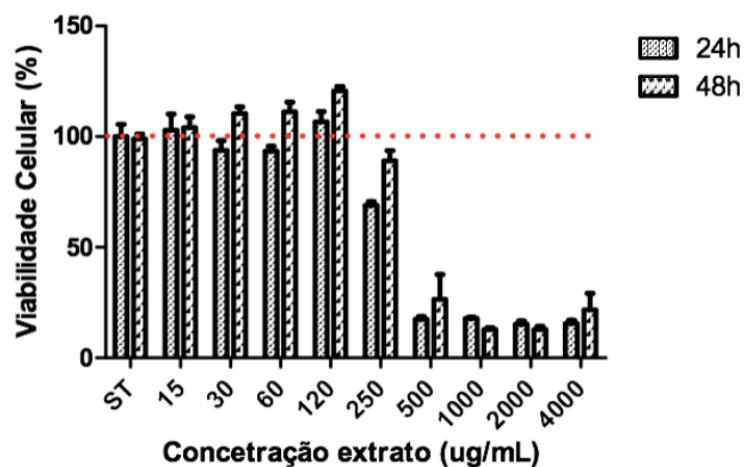


Figura 20 - Efeito do extrato de própolis na viabilidade celular de fibroblastos 3T3-L1 em 24h e 48h. Controle ST (sem tratamento).

O extrato da própolis de copaíba nas concentrações entre 15 e 120 µg/mL mostrou um aumento no número de células viáveis às 48h quando comparadas com as outras concentrações testadas e o controle sem tratamento (100%). No período de 24h nas mesmas concentrações, observou-se um ligeiro aumento do número de células viáveis, apesar de ter sido mais baixo do que apresentado pelo controle. Já para o tratamento com 250 µg/mL, embora a quantidade de células fosse menor que o controle (67% para 24h e 89% para 48h) observou-se que quanto maior o tempo, o efeito sobre a proliferação é maior.

No caso do tratamento nas concentrações entre 500 e 4000 µg/mL, o número de células viáveis diminuiu com o aumento da concentração, com um número de células menor que 50% quando comparado com o controle.

Assim, todas as concentrações maiores do que a concentração de 100 µg/mL mostraram uma menor atividade de proliferação/viabilidade celular em comparação com o controle. As diferenças entre os diferentes tratamentos e o controle não foram estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto, apresenta-se uma tendência crescente do crescimento celular para baixas concentrações (até 120 µg/mL).

6 - DISCUSSÃO

A descoberta de produtos naturais eficazes no combate às espécies da *Candida* spp. é fundamental no tratamento da candidíase oral, em decorrência do aumento da resistência aos antimicrobianos convencionais (ANIBAL *et al.*, 2010). Apesar do grande número de estudos sobre a aplicabilidade de produtos naturais no tratamento da candidíase oral, existe uma variedade muito grande de produtos naturais testados e suas formas de apresentação, sendo difícil padronizar os critérios metodológicos, seja no desenho do estudo ou na escolha do produto de teste, concentrações e formulações farmacêuticas (FERREIRA *et al.*, 2015).

Zida *et al.* (2017), realizaram uma extensa revisão de literatura sobre o uso de produtos naturais como novas drogas antifúngicas e, dentre 111 trabalhos publicados, foram destacados 142 produtos naturais anti-*C. albicans*. A Ásia (44,37%) é o continente com mais relatos, seguido da América (28,17%). De acordo com critérios *in vitro*, a atividade

antifúngica foi considerada de moderada a importante em 45% dos produtos. Dezesesseis produtos tiveram sua atividade antifúngica confirmada em experimentos *in vivo* e efeitos sinérgicos foram encontrados entre diferentes classes de produtos naturais, bem como entre produtos naturais e azóis. Este trabalho sugere que o uso de produtos naturais é mais comum em países pobres e em desenvolvimento, provavelmente pelo maior número de habitantes nas zonas rurais e pela dificuldade de acesso aos serviços de saúde e medicamentos convencionais, sendo uma alternativa de baixo custo.

No Brasil, um estudo recente revelou que a *Candida* spp. foram o sétimo grupo de microorganismos associados ao quadro de infecções sistêmicas. Além disso, as taxas de mortalidade por candidemia no Brasil continuam a ser cada vez mais altas do que as observadas nos países do Hemisfério Norte, enfatizando a necessidade de melhorar as práticas locais de manejo clínico, incluindo o diagnóstico precoce, controle de fontes e terapia antifúngica precisa (DOI *et al.* 2016).

A formação de biofilme é apontada como o principal fator de virulência da *Candida* spp., e a capacidade de formá-lo depende da espécie envolvida e da sua origem clínica (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.* 2013). Apesar da *Candida albicans* ser a espécie mais comum, a proporção entre *Candida albicans* e não-albicans tem sido modificada pelo aumento das espécies não-albicans (MUADCHEINGKA e TANTIVITAYAKUL, 2015). Sendo assim, é importante identificar e estudar espécies não-albicans além da *Candida albicans*, na patogênese da candidíase oral. O presente trabalho avaliou a susceptibilidade antifúngica a um novo tipo de própolis, da *Candida albicans* e duas espécies não-albicans, citadas na literatura como causadoras de candidíase oral: *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (MUADCHEINGKA e TANTIVITAYAKUL, 2015; AINAPUR *et al.*, 2017).

A própolis estudada no presente trabalho foi coletada na região oeste do estado de Minas Gerais, Brasil, onde é relativamente comum. O estado de Minas Gerais está localizado na região sudeste do Brasil e é um dos principais responsáveis pela produção da própolis verde brasileira (PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002). No entanto, o aspecto físico e coloração da nova própolis diferem da tradicional própolis verde brasileira, sendo inclusive coletada separadamente pelos apicultores locais. A presença abundante de árvores de

Copaifera spp. na região, sugere que o principal constituinte botânico da nova própolis seja a copaíba.

As propriedades biológicas de um tipo de própolis estão relacionadas à sua composição química e mais especificamente aos compostos fenólicos, que variam em sua estrutura química e concentração, dependendo da região e das fontes de coleta, além da técnica utilizada para produção e a estação do ano em que a própolis é produzida (TORETI *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2016). Seleem, Pardi e Murata (2017) ressaltam que os flavonóides identificados na própolis são encontrados de forma variada, quantitativa ou qualitativamente e que a sua atividade antifúngica contra *C. albicans in vitro* está relacionada à presença dos seguintes compostos: quercetina, catequinas e miricetina (flavonóis), baicaleína (flavonas) e carvacrol (chalconas). Apesar de terem sido isolados somente dois compostos fenólicos, a presença de fenóis, dentre eles flavonóides apontam que a própolis aqui estudada possui compostos químicos potencialmente ativos. Trabalhos futuros deverão analisar e identificar os compostos químicos da própolis estudada a partir do seu isolamento por técnicas cromatográficas e a caracterização por métodos espectroscópicos como ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectro de massas, além de técnicas hífenadas como Cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS).

A perspectivas para trabalhos futuros é avaliar se a própolis tem realmente origem na copaíba, pela sua comparação com amostras da planta (brotos, folhas e óleo-resina) utilizando técnicas cromatográficas, como realizado por Park, Alencar e Aguiar (2002). O óleo-resina de copaíba é uma fonte potencial de novos fármacos e seletivos para o tratamento de doenças infecciosas importantes. É amplamente usado na medicina popular e silvícola há séculos e possui várias aplicações terapêuticas, incluindo ação anti-inflamatória, cicatrização de feridas, antimicrobiana, leishmanicida, antineoplásica e anestésica (VEIGA JR. *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2012; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

Existe uma discrepância na literatura em relação à atividade antifúngica dos diversos tipos de própolis pelo mundo. A Tabela 6 mostra alguns dos principais trabalhos que avaliaram *in vitro*, o efeito de extratos de própolis contra espécies de *Candida* spp. A maioria deles confirmou o potencial antifúngico dos extratos de própolis, a principal espécie estudada é a *Candida albicans* e as metodologias são variáveis, com destaque para a difusão em ágar e

diluição em caldo. A variação de resultados é explicada pelas diferentes composições químicas e origem botânica dos extratos de própolis pelo mundo e no Brasil, suas concentrações e método de produção do extrato.

Tabela 6 - Atividade antifúngica *in vitro* de extratos de própolis contra espécies de *Candida* spp.

| | Origem geográfica da própolis | Origem botânica da própolis | Método de ensaio antimicrobiano | Espécies de <i>Candida</i> spp. testadas | Atividade antifúngica |
|---------------------------------------|--|------------------------------------|--|---|------------------------------|
| Kujumgiev <i>et al.</i> (1999) | Bulgária (01 amostra) Albânia (01 amostra) Mongólia (01 amostra) Egito (01 amostra) Ilhas Canárias (02 amostras) Brasil (06 amostras) | - | Método de perfuração em ágar | <i>C. albicans</i> | Presente |
| Martins <i>et al.</i> (2002) | Brasil | - | Difusão em ágar com disco | <i>C. albicans</i> | Presente |

| | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------------|--|---|
| Salomão et al. (2004) | Bulgária (região sudeste) | <i>Populus nigra</i> | Método de perfuração em ágar | <i>C. albicans</i> | Presente |
| | Brasil (Minas Gerais) | "Mistura de plantas tropicias" | | | |
| Silici et al. (2005) | Turquia | - | Microdiluição em caldo | <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> | Presente |
| | | | e Difusão em ágar | | |
| de Paula et al. (2006) | Brasil | <i>Baccharis dracunculifolia</i> | Macrodiluição em caldo | <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. guilliermondii</i> | Presente |
| Kalogeropoulos et al. (2009) | Grécia (10 amostras) | | Método de perfuração em ágar | <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> | Presente |
| | Chipre (02 amostras) | | | | |
| Popova et al. (2011) | Malta (17 amostras) | <i>Ferula communis</i> | Método de perfuração em ágar | <i>C. albicans</i> | Presente (06 amostras) Ausente (11 amostras) |

| | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|----------|
| Monzote <i>et al.</i> (2012) | Cuba (20 amostras) | - | Método colorimétrico com Resaruzina | <i>C. albicans</i> | Ausente |
| Boisard <i>et al.</i> (2015) | França | <i>Populus</i> spp. | Microdiluição em caldo | <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> | Presente |
| Freires <i>et al.</i> (2016) | Brasil (região sul) | <i>Dalbergia ecasto-phyllum</i> | Microdiluição em caldo | <i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. glabrata</i> | Presente |
| | Brasil (região nordeste) | <i>Populus</i> spp. | Microscopia eletrônica de varredura | <i>C. kruzei</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> | |
| Akca <i>et al.</i> (2016) | Turquia | - | Macro e Microdiluição em caldo | <i>C. albicans</i> | Presente |
| Dantas <i>et al.</i> (2017) | Brasil (região sul - 04 amostras) | - | Microdiluição em caldo | <i>C. albicans</i> | Ausente |
| | Brasil (região nordeste 2 amostras) | | | | |
| | Brasil (região sudeste 2 amostras) | | | | |

Os testes antimicrobianos realizados neste estudo são amplamente utilizados nos laboratórios de microbiologia pelo mundo. Segundo Silici *et al.* (2005) os testes de diluição em caldo e difusão em ágar fornecem resultados comparáveis, mas não idênticos.

De uma forma geral, atividade antifúngica do extrato de própolis de copaíba foi considerada moderada, já que a atividade *in vitro* dos fitoquímicos é considerada significativa

se os valores de CIM estiverem abaixo de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para extrato bruto e moderados quando os valores de CIM variarem de 100 a 625 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (ZIDA *et al.*, 2017; FREIRES *et al.*, 2015). Outros autores encontraram melhores resultados dos encontrados neste trabalho. Silici *et al.* (2005) testaram os efeitos antifúngicos das amostras de própolis de diferentes regiões da Turquia e encontraram valores de CIM variando de 0,03 a 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *C. albicans* e *C. glabrata*. Freires *et al.* (2016) avaliaram amostras dos tipos 3 e 13 da própolis brasileira e também encontraram que ambos os extratos podem ser considerados como tendo atividade antifúngica muito forte contra as cepas de seis espécies de *Candida* spp., com valores de CIM variando de 1,0 a 31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Além disso, notou-se as espécies não-*albicans* apresentaram maiores valores de CIM e CFM, o que pode explicar a resistência antifúngica no tratamento da candidíase oral.

As médias das zonas de inibição contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. Krusei* variaram entre 10.31 mm (± 1.52) e 16,67mm ($\pm 0,70$) para o EPC e 9.00mm (± 1.73) e 11,67 mm ($\pm 1,52$) para o enxaguante bucal. Outros autores encontraram valores superiores de extratos de própolis mediterrâneos e encontraram as médias das zonas de inibição e variando entre 14.0mm(± 2.00) e 28.4mm (± 0.88) contra *C. albicans* e *C. glabrata* (SILICI *et al.*, 2005). Além disso, a presença de colônias resistentes nos halos de inibição sugere que o produto seja fungistático, característica interessante para um enxaguante bucal. Quando existe um equilíbrio adequado, as leveduras são benéficas para o corpo e o tratamento da candidíase não busca a sua erradicação, mas sim uma restauração da relação ecológica adequada e equilibrada entre o homem e a levedura (SINGH *et al.*, 2014).

Em relação aos testes de citotoxicidade, pôde-se estabelecer que o extrato de própolis de copaíba exerce, em baixas concentrações, um efeito dose dependente sobre a proliferação de fibroblastos 3T3-L1 e pode exercer um efeito regenerador de tecidos. Porém, em altas concentrações o extrato tem poder citotóxico e não permite a proliferação celular. Uma das razões pelas quais o extrato avaliado teve um efeito tóxico em concentrados maiores está relacionada com as características de solubilidade do extrato no meio de cultura, que levou a formação de flóculos no precipitado, podendo afetar o crescimento das células.

O comportamento apresentado pelo tratamento dos fibroblastos 3T3-L1 com o extrato de própolis de copaíba em baixas concentrações concorda com o reportado na literatura para

outros tipos de própolis os quais tem uma tendência a promover a proliferação do crescimento de fibroblastos nesta linhagem celular (GRENHO *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudos sugerem que diversos extratos de própolis brasileiros, da Malásia e Cuba podem apresentar um efeito tanto estimulador como um efeito inibidor sobre a migração e proliferação de células envolvidas em processos de regeneração e, que esse tipo de efeito depende do tipo de célula, tipo de própolis, das concentrações avaliadas e o tipo de solvente utilizado nos ensaios (NAJAFI *et al.*, 2007; GJERTSEN *et al.*, 2011; JACOB *et al.*, 2015). Já no caso de própolis para uso em cavidade oral, é conhecido que a própolis exerce mínima toxicidade tanto em fibroblastos do ligamento periodontal quanto da polpa dentária em concentrações menores de 4 mg/mL (4000ug/mL) (AL-SHAHER *et al.*, 2004) o que concorda com os resultados obtidos no presente trabalho.

A grande diversidade de própolis dificulta sua padronização química e limita a aplicação de própolis nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Um produto, para ser utilizado em grande escala pelos sistemas de saúde deve obedecer parâmetros que garanta a sua qualidade, segurança e eficácia. Trabalhar com material padronizado permitiria que os pesquisadores relacionassem um tipo específico de constituinte químico com uma atividade biológica específica (BANKOVA, 2005). As investigações devem ser realizadas não só para encontrar novos produtos naturais anti-*Candida*, mas também para identificar a composição micromolecular responsáveis pelas atividades farmacológicas (ZIDA *et al.*, 2017). Ainda há necessidade do desenvolvimento de estudos com mais rigor metodológico, incluindo cuidados como o cálculo do tamanho da amostra, randomização, cegamento, estudo piloto, calibração dos pesquisadores, controle de uso do produto e de perda de amostras (FERREIRA *et al.*, 2015).

7 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados sobre a própolis investigada, pode-se concluir que:

- Apresenta potencial antifúngico moderado contra espécies do gênero *Candida* spp.;
- Espécies de *Candida* não-albicans foram menos sensíveis ao produto testado;

- Sua composição química, com a presença de ácidos fenólicos e flavonóides, indica a presença de substâncias biologicamente ativas;
- O Extrato de Própolis de Copaíba (EPC) exerce, em baixas concentrações, um efeito dose dependente sobre a proliferação de fibroblastos 3T3-L1 e pode exercer um efeito regenerador de tecidos;
- O enxaguante da própolis de copaíba pode ser uma alternativa no controle da candidíase oral;
- Estudos futuros sobre a caracterização dos seus compostos químicos, aperfeiçoamento do produto e ensaios clínicos deverão ser realizados.

8 - REFERÊNCIAS

1. ABRÃO, F.; COSTA, L.D.A.; ALVES, J.A.M. *et al.* *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med.* v.15, p. 1-10, 2015.
2. AINAPUR, M.M.A.R.; MAHESH, P.; KUMAR, K. *et al.* An in vitro study of isolation of candidal strains in oral squamous cell carcinoma patients undergoing radiation therapy and quantitative analysis of the various strains using CHROMagar. *J Oral Maxillofac Pathol.* v.21, p.11–17, 2017.
3. AKCA, A.E.A.; AKCA, G.; TOPÇU, F.T. *et al.* The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: an in vitro study. *Biomed Res Int.* 2016, p.1-8, 2016.
4. AKPAN, A. e MORGAN, R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* v.78, p.455–459, 2002.
5. ALBUQUERQUE, K.C.O.; VEIGA, A.S.S.; SILVA, J.V.S. *et al.* Brazilian amazon traditional medicine and the treatment of difficult to heal Leishmaniasis wounds with *Copaifera*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017, p.1-9, 2017.

6. ALENCAR, S.M.; CADORIN, T.L.; CASTRO, M.L. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol.* v.113, p.278-83, 2007.
7. AL-KARAAWI, Z.M.; MANFREDI, M.; WAUGH, A.C.W. *et al.* Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol.* v.17, p.44-49, 2002.
8. AL-SHAHER, A.; WALLACE, J.; AGARWAL, S. *et al.* Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod.* v.30, n.5, p.359-361, 2004.
9. ANIBAL, P.C.; SARDI, J.C.O.; PEIXOTO, I.T.A. *et al.* Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Braz J Microbiol.* v.41, p.824-831, 2010.
10. AXÉLL, T.; SAMARANAYAKE, L.P.; REICHART, P.A. *et al.* A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.84, p.111–112, 1997.
11. BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* v.100, p.114-117, 2005.
12. BARDAJÍ, D.K.R.; DA SILVA, J.J.M.; BIANCHI, T.C. *et al.* *Copaifera reticulata* oleoresin: chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe.* v.40, p.18-27, 2016.
13. BOISARD, S.; LE RAY, A.M.; LANDREAU, A. *et al.* Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015, p.1-10, 2015.
14. BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol.* v.36, p.347-363, 1998.
15. CAIRO DO AMARAL, R.; GOMES, R.T.; ROCHA, W.M.S. Periodontitis treatment whit Brazilian green propolis gel. *Pharmacologyonline.* v.3, p.336-341, 2006.

16. CAPISTRANO, H.M.; ASSIS, E.M.; LEAL, R.M. *et al.* Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of candida-associated denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, p.1-6, 2013.
17. CONTI, B.J.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Chemical composition of the same Brazilian propolis sample analyzed in 1997 and in 2012: no freezing effect. *Nat Prod Commun.* v.10, p.1279–1280, 2015.
18. CORONADO-CASTELLOTE, L. e JIMÉNEZ-SORIANO, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* v.5, p.279-86, 2013.
19. CORREIA, A.F.; SILVEIRA, D.; FONSECA-BAZZO, Y.M. *et al.* Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complement Altern Med.* v.16, p.1-6, 2016.
20. DE LUCA, M.P.; FRANÇA, J.R.; MACEDO F.A.F.F. *et al.* Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int.* 2014. p.1-6, 2014.
21. DE PAULA, A.M.B.; GOMES, R.T.; SANTIAGO, W.K. *et al.* Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to Brazilian green propolis extract. *Pharmacologyonline.* v.3, p.467-473, 2006.
22. DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N. e ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* v.13, p.1-7, 2011.
23. DEUS, R.J.A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S. *et al.* Efeito fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* v.11, p.347-353, 2009.
24. DOI, A.M.; PIGNATARI, A.C.C.; EDMOND, M.B. *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS ONE.* v.11, p. 1-9, 2016.

25. FARAH, C.S.; LYNCH, N.; MJ McCULLOUGH, M.J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J.* v.55, p.48–54, 2010.
26. FERREIRA, G.L.; PÉREZ, A.L.; ROCHA, Í.M., *et al.* Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med.* v.14, p.78-84, 2015.
27. FREIRES, I.A.; DENNY, C.; BENSO, B. *et al.* Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules.* v.20, p.7329-58, 2015.
28. FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.P.P.; FURLETTI, V.F. *et al.* Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycol Med.* v.26, p.122-132, 2016.
29. GARCIA-CUESTA, C., SARRION-PÉREZ, M.G. e BAGÁN, J.V. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. *J Clin Exp Dent.* v. 5, n.5, p. 576-82, 2014.
30. GHANNOUM, M.A.; JUREVIC, R.J.; MUKHERJEE, P.K. *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* v.6, p. 1-8, 2010.
31. GJERTSEN, A.W.; STOTHZ, K.A.; NEIVA, K.G. *et al.* Effect of propolis on proliferation and apoptosis of periodontal ligament fibroblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.112, n.6, p.843-848, 2011.
32. GONÇALVES, L.S.; JÚNIOR, A.S.; FERREIRA, S.M.S. *et al.* Factors associated with specific clinical forms of oral candidiasis in HIV-infected Brazilian adults. *Arch Oral Biol.* v.58, p.657-663, 2013.
33. GONELA, A.; SEBBENN, A.M.; SORIANI, H.H. *et al.* Genetic diversity and mating system of *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae/Caesalpinioideae). *Genet Mol Res.* v. 12, p.569-580, 2013.

34. GRENHO, L.; BARROS, J.; FERREIRA, C. *et al.* In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. *Biomed Mater.* v.10, n.2, p.1-8, 2015.
35. Guidelines on the treatment of skin and oral HIV-associated conditions in children and adults. *World Health Organization (WHO)*, 2014.
36. HUANG, S.; CUI-PING ZHANG, C.; WANG, K. *et al.* Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.*v.9, p.19610-19632, 2014.
37. JACOB, A.; PAROLIA, A.; PAU, A. *et al.* The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *BMC Complement Altern Med.* v.15, p.1-10, 2015.
38. KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S.J.; TROULLIDOU, E. *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem.* v.116, p.452–461, 2009.
39. KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* v.64, n.3, p.235-40, 1999.
40. LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S. *et al.* Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules.* v. 17, p. 3866-3889, 2012.
41. LYNCH, D.P. Oral candidiasis history, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.78, p.189-193, 1994.
42. MACHADO, B.A.S.; SILVA, R.P.D; BARRETO, G.A. *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS ONE.* v.11, p.1-26, 2016.
43. MARTINS, R.S.; PEREIRA, E.S.J.; LIMA JR, S.M. *et al.* Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from

- HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci.* v.44, p.41-48, 2002.
44. MARTY, M.; BOURRAT, E.; VAYSSE, F. *et al.* Direct microscopy: a useful tool to diagnose oral candidiasis in children and adolescents. *Mycopathologia.* v.180, p. 373-377, 2015.
45. MELLO, A.M.; GOMES, R.T.; LARA, S.R. *et al.* The effect of Brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*. *Pharmacologyonline.* v.3, p.352-358, 2006.
46. MILLSOP, J.W. e FAZEL, N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol.* v.34, p.487–494, 2016.
47. MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C. *et al.* In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.107, n.8, p.978-984, 2012.
48. MUADCHEINGKA, T. e TANTIVITAYAKUL, P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol.* v.60, p. 984-901, 2015.
49. NAJAFI, M.F.; VAHEDY, F.; SEYYEDIN, M. *et al.* Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology.* v.54, p.49-56, 2007.
50. NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; Norma aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
51. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

52. NITTAYANANTA, W. Oral fungi in HIV: challenges in antifungal therapies. *Oral Dis.* v. 22 (Suppl. 1), p.107–113, 2016.
53. ODDS, F.C. e BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* v. 32, p.1923-1929, 1994.
54. OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Braz J Pharmacognosy.* v.18, n.2, p.301-307, 2008.
55. PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* v.50, n.9, p.2502-2506, 2002.
56. PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* v.62, p.2230-2232, 1998.
57. PATIL, S.; RAO, R.S.; MAJUMDAR, B. *et al.* Clinical appearance of oral candida infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol.* v.6, p.1-10, 2015.
58. PEREIRA, E.M.R.; SILVA, J.L.D.C.; SILVA, F.F. *et al.* Clinical evidence of the efficacy of a mouthwash containing propolis for the control of plaque and gingivitis: a phase II study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011. p.1-7, 2011.
59. PFALLER, M.A.; HUSTON, A.; COFFMAN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* v. 34, p.56-61, 1996.
60. PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.M.; FIORINI, J.E. *et al.* Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J.* v.13, p.36-38, 2012.

61. PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.* v.11, n.4, p.465-472, 2009.
62. PINA, G.M.S.; LIA, E.N.; BERRETTA, A.A. *et al.* Efficacy of propolis on the denture stomatitis treatment in older adults: a multicentric randomized trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017, p.1-9, 2017.
63. POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; ANTONOVA, D. *et al.* The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* v.126, p.1431– 1435, 2011.
64. SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M. *et al.* Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol.* v.38, n.2, p.87-92, 2004.
65. SÁNCHEZ-VARGAS, L.O.; ESTRADA-BARRAZA, D.; POZOS-GUILLEN, A.J. *et al.* Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol.* v. 58, p.1318-1326, 2013.
66. SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P. *et al.* Antimicrobial activity of brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.103, n.3, p. 277-281, 2008.
67. SANTOS, V.R. Propolis: alternative medicine for the treatment of oral microbial diseases. *Alternative Medicine.* 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/alternative-medicine/antifungal-activity-of-propolis-oral-clinical-studies-in-humans>. Acesso em: 05 maio. 2015.
68. SANTOS, V.R.; GOMES, R.T.; MESQUITA, R.A. *et al.* Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res.*v. 22, p. 1544 –1547, 2008.
69. SANTOS, V.R.; PIMENTA, F.J.; AGUIAR, M.C. *et al.* Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytother Res.* v.19, p.652-654, 2005.

70. SCHMIDT, E.M.; STOCK, D.; CHADA, F.J.G. *et al.* A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *Biomed Res Int.* 2014, p.1-10, 2014.
71. SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R.M. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Arch Oral Biol.* v.76, p.76-83, 2017.
72. SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis.* v.14, p.582-90, 2008.
73. SFORCIN, J.M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother. Res.* v. 30, p.894–905, 2016.
74. SILICI, S.; KOÇ, N.A.; AYANGIL, D. *et al.* Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharm- macol Sci.* v.99, p.39-44, 2005.
75. SIMÕES, C.A.C.G.; CONDE, N.C.O.; VENÂNCIO, G.N. *et al.* Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm. *Open Dent J.* v. 10 (Suppl-1), p.188-195, 2016.
76. SINGH, A.; RENUKA, V.; MURARI, A. *et al.* Oral candidiasis: an overview. *J Oral Maxillofac Pathol.* v. 18(Suppl 1), p.81–85, 2014.
77. SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Inter.* 2013, p.1-13, 2013.
78. STUPP, A.; DE FREITAS, R.A.; SIERAKOWSKI, R.A. *et al.* Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. *Bioresour Technol.* v.99, p. 2659–2663, 2008.
79. TORETI, V.C.; SATO, H.H.; PASTORE G.M. *et al.* Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013. p.1-13. 2013.

80. VEIGA JR., V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V. *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* v.112, p.248–254, 2007.
81. VICENTE, M.F.; BASILIO, A.; CABELLO, A. *et al.* Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect.* v.9, p.15–32, 2003.
82. WAGH, V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci.* 2013. p.1-11, 2013.
83. ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; BARREIRA, S. M. W. *et al.* Mouthwasher: active principles and development of a formula with hidroalcoholic extract of *Salvia officinalis*. *L. Visão Acadêmica.*v.8, p.19-24, 2007.
84. ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA A. *et al.* Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: a review. *J Mycol Med.*v. 27, p.1-19, 2017.