



# Atividade *in vitro* do extrato etanólico de própolis e do digluconato de clorexidina sobre as espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)

*In vitro* activity of ethanolic extract of propolis and chlorhexidine digluconate on *Candida* species isolated from the oral mucosa of patients hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU)

RIALA6/1750

Maria Luisa MAKABE<sup>1</sup>, Patricia de Souza SANTOS<sup>2</sup>, Maria de Fátima Costa PIRES<sup>2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Núcleo de Microscopia Eletrônica, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2909. E-mails: [patyfatima@hotmail.com](mailto:patyfatima@hotmail.com); [mfpieres@saude.sp.gov.br](mailto:mfpieres@saude.sp.gov.br)

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 25/06/2018 - Aceito para publicação 15/10/2018

## RESUMO

Avaliou-se a atividade dos extratos de própolis e digluconato de clorexidina em *Candida sp* isoladas da mucosa bucal de pacientes em UTI. Foram determinadas as concentrações fungicidas mínimas (CFM) e comparadas, nas doses sub-inibitórias, à produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e formação de franjas. Em 72 isolados foram avaliadas a atividade antifúngica pela técnica de microdiluição em série, na “base 2”, a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase, e a formação de franjas, antes e após a exposição às própolis e clorexidina. Dos 72 isolados, 53 eram *C. albicans*, 11 *C. tropicalis*, quatro *C. guilhermondii* e quatro sugestivas de *C. dubliniensis*. CFM 90% do extrato de própolis foi de 5% para *C. albicans*, 20% *C. tropicalis*, 0,625% *C. guilhermondii* e 0,312% sugestivas de *C. dubliniensis*. CFM 90% da clorexidina foi de 0,0018% para *C. albicans*, 0,012% *C. tropicalis*, de 0,0018% *C. guilhermondii* e de 0,00375% sugestivas de *C. dubliniensis*. Ocorreu inibição das exoenzimas e franjas, em ambos os produtos. Apesar da inibição da clorexidina ser menor que a da própolis, seu uso diário não causa efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal.

**Palavras-chave.** *Candida albicans*, própolis, clorexidina.Z.

## ABSTRACT

The activity of propolis extract and chlorhexidine digluconate on *Candida sp* isolated from oral mucosa of patients in ICU was evaluated. The minimum fungicidal concentrations (MFC) were determined, and also the production of proteinase and phospholipase exoenzymes and the fringe formation. Seventy-two isolates were used and identified by the API 20C AUX® System. The antifungal activity was evaluated by “at base 2” serial microdilution technique. Also the exoenzymes production (proteinase and phospholipase), the fringes formation, before and after being exposed to propolis and chlorhexidine, were analysed. Of 72 isolates, 53 were *C. albicans*, 11 *C. tropicalis*, four *C. guilhermondii* and four suggestive *C. dubliniensis*. The MFC 90% of propolis extract was 5% *C. albicans*, 20% *C. tropicalis*, 0.625% *C. guilhermondii*; and 0.312% suggestive of *C. dubliniensis*. MFC 90% of chlorhexidine was 0.0018% *C. albicans*, 0.012% *C. tropicalis*, 0.0018% *C. guilhermondii* and 0.00375% suggestive of *C. dubliniensis*. The inhibition of exoenzymes and fringes occurred in the both products. Although the inhibition of chlorhexidine is lower than that showed by propolis, its daily use neither cause undesirable side effects as blemishes on the teeth and tongue, nor the loss of the taste and the burning sensation in the oral mucosa.

**Keywords.** *Candida albicans*, propolis, chlorhexidine.

## INTRODUCTION

*Candida albicans* é a espécie responsável pelo maior número de casos de morbidade e mortalidade em indivíduos hospitalizados infectados por fungos, pois podem causar infecções tanto superficiais como sistêmicas<sup>1</sup>. Apesar de *C. albicans* ter sido a espécie mais isolada, nos últimos anos houve um aumento do número de infecções invasivas por espécies não-*albicans*, como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, entre outras e mais recentemente por *Candida auris*<sup>2,3</sup>.

Os focos de infecção na boca têm sido associados ao comprometimento da saúde do indivíduo, e tem despertado o interesse de médicos e dentistas<sup>4</sup>. A infecção nosocomial é frequente e de elevada mortalidade em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Podem-se dividir as infecções em exógenas, quando o agente patogênico infectante é adquirido no meio externo, ou endógenas quando este pertence à microbiota do hospedeiro. O paciente na UTI é colonizado precocemente por agentes potencialmente patogênicos adquiridos no meio externo. E estes modificam a microbiota residente de tal maneira que as infecções endógenas podem ser subdivididas em primárias (infecções produzidas pela microbiota do paciente) e secundárias (infecções produzidas pela microbiota adquirida em UTI)<sup>5</sup>.

As leveduras, como muitos micro-organismos patogênicos, possuem fatores de virulência que têm um papel essencial na evolução do processo infeccioso<sup>6</sup>.

Os fungos representam um grande desafio no desenvolvimento de substâncias terapêuticas, considerando-se as semelhanças que existem entre a célula fúngica e a célula humana. Uma grande quantidade de medicamentos obtida da síntese orgânica é utilizada no tratamento de infecções fúngicas. Os antissépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, quinonas e antifúngicos poliênicos como a nistatina e anfotericina são amplamente utilizados nesta terapia<sup>7,8</sup>. Além disso, há os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, voriconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona,

morfolina, compostos de selênio e anfotericina B lipossomal<sup>7</sup>.

O fluconazol é o medicamento antifúngico mais utilizado no tratamento das candidíases<sup>9</sup>. Mas, *C. albicans* tem demonstrado uma crescente resistência a este medicamento, bem como aos outros antifúngicos existentes no mercado<sup>10</sup>. Nova espécie de *Candida* também tem demonstrado ser mais resistente aos antifúngicos de primeira linha<sup>11</sup>.

Existe urgência na descoberta de novos fármacos em função destas resistências. A literatura, há tempos, relata a atividade antimicrobiana de extratos naturais, extraídos das mais diversas fontes.

Própolis é uma substância resinosa, elaborada pelas abelhas a partir da coleta de exsudados das plantas que rodeiam as colmeias, e estes são adicionados às secreções salivares e às ceras produzidas pelas abelhas. É utilizada como proteção contra os micro-organismos na colmeia, e para embalsamar pequenos animais mortos (besouros e insetos), para evitar putrefação, infecções e doenças<sup>12</sup>. Reconhecida pelas suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno, a própolis foi empregada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas de soldados em batalhas, bem como “desinfetante” bucal. Própolis possui cheiro característico e mostra propriedades adesivas por interagir fortemente com os óleos e proteínas da pele<sup>13,14</sup>.

O interesse em se pesquisar a própolis aumentou consideravelmente e este fato está associado às suas várias propriedades biológicas<sup>15,16</sup>. A própolis tem se destacado pela sua aplicabilidade na indústria de alimentos e cosméticos, e por ser utilizada como princípio ativo em vários produtos, como dentifrícios e cremes dermatológicos<sup>17</sup>.

Os estudos sobre o uso e a aplicação da própolis já foram realizados em diferentes especialidades da odontologia, entre elas na cariologia, cirurgia bucal, endodontia e periodontia<sup>18</sup>. O emprego de produtos naturais na clínica odontológica tem sido justificado pelo seu uso popular, por seu baixo custo e pelos efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios<sup>15</sup>.

A solução aquosa de digluconato de clorexidina possui amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus lipofílicos.

Possui permanência ativa de 12 horas na cavidade bucal e é comumente utilizada como solução aquosa na concentração de 0,12%<sup>19</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade do extrato etanólico de própolis a 20% e de digluconato de clorexidina a 0,12% sobre *C. albicans* e não-albicans, isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). E também, para determinar as concentrações fungicidas mínimas e comparar antes e após o contato com extrato etanólico de própolis e digluconato de clorexidina nas doses sub-inibitórias, a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e as características fenotípicas das leveduras. Espera-se com este estudo identificar o produto mais adequado na higienização bucal de pacientes internados em UTI.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 72 isolados de leveduras da mucosa bucal de pacientes adultos, de ambos os sexos, internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um Hospital Público na cidade de São Paulo. Em função da situação dos pacientes, o convite para a participação na pesquisa foi realizado aos respectivos parentes ou responsáveis. Após serem devidamente esclarecidos, os responsáveis consentiram voluntariamente que os pacientes participassem da pesquisa, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Como critério de inclusão para participarem nesta pesquisa, os pacientes deveriam ser: maiores de 18 anos e não serem portadores de deficiência mental.

Para a pesquisa de leveduras, a coleta das amostras foi realizada na mucosa jugal com o auxílio de swabs estéreis umedecidos em solução fisiológica 0,85%. Para o isolamento das leveduras, o material contido nos swabs foi semeado em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose (Difco), e acrescido de 200 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram identificadas e incubadas a 25°C até 7 dias.

O extrato etanólico de própolis na concentração a 20% foi adquirido da empresa Apis Flora®, localizada na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

O digluconato de clorexidina foi adquirido da Índia pela empresa Deg Importação de Produtos Químicos LTDA na concentração de 20%. Para o uso,

este reagente foi diluído em água destilada estéril para obter a concentração de 0,12%; e este processamento foi realizado pela Farmácia de manipulação - Pró Manipulação localizada em São Paulo, SP.

Todos os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e identificados no Sistema API 20C AUX da BioMerieux®. A produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase e a produção de franjas foram avaliadas antes e após o contato com a dose sub-inibitória, utilizando-se as técnicas descritas por Ruchel et al<sup>20</sup>, Price et al<sup>21</sup> e Hunter et al<sup>22</sup>, respectivamente. A atividade enzimática da proteinase e da fosfolipase foi observada pela formação de um halo de precipitação (proteinase) e de degradação (fosfolipase) ao redor da colônia (PZ). PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de precipitação (zd),  $PZ = dc/dc + zd$ , sendo  $Pz = 1,0$  - ausência de produção;  $1,0 < Pz < 0,64$  - produtor;  $Pz < 0,64$  - altamente produtor.

A produção de franjas foi avaliada analisando-se os aspectos macro-morfológicos da franja, de acordo com o modelo de tipificação de Hunter et al<sup>22</sup>: 1º Franja - distribuição: Ausente (0); Descontínua (>20% da margem) (1); Descontínua (21 a 50% da margem) (2); Descontínua (51 a 90% da margem) (3); Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); Contínuas com filamentos paralelos (7). 2º Franja- comprimento: Ausente (0); Igual ou menor do que 2 mm (2), De 3 a 5 mm (3); Igual ou maior do que 6 mm (5).

A atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis (a partir de 20%) e do digluconato de clorexidina (a partir de 0,12%) foi pesquisada utilizando-se o teste de microdiluição em série, na “base 2”, em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), sem adição de solvente ou produto tensoativo.

Neste teste foram incluídos (i) controle negativo - para verificar a esterilidade do meio de RPMI-1640, (ii) controle negativo do extrato etanólico de própolis e (iii) controle positivo para crescimento da levedura (meio + inóculo). Foi ainda utilizado o etanol a 58°GL, como controle do extrato etanólico de própolis.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi obtida semeando-se 5µL de cada microdiluição (amostra) em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, e incubadas a 37°C durante 24 h.

### Considerações éticas

A presente pesquisa seguiu inicialmente a Resolução 196/96 e na seqüência 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil 2012). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, sob o protocolo n° 293253 - PH/CEP.

### RESULTADOS

Dos 72 isolados de leveduras identificados, 53 foram *C. albicans*, 11 *C. tropicalis*, quatro *C. guilhermondii* e quatro sugestivas de *C. dubliniensis*.

O etanol 58°GL não interferiu na inibição do crescimento em nenhum dos 72 isolados de leveduras.

As concentrações fungicidas mínimas (CFM) do extrato etanólico de própolis e de digluconato de

clorexidina estão apresentadas na **Tabela**.

Quanto à atividade do extrato etanólico de própolis sobre a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase, observou-se que antes do contato com o extrato de própolis, dos 53 isolados de *C. albicans*, 26 (49,05%) foram produtores de proteinase, um (1,90%) foi altamente produtor e 26 (49,05%) não produtores. Após o contato com o extrato de própolis, 23 (88,46%) dos 26 isolados de *C. albicans* deixaram de produzir esta enzima. Três (11,54%) isolados passaram de produtor para altamente produtor, e um não produtor passou a produzir esta enzima. Para *C. tropicalis*, três (27,27%) isolados produziram proteinase; mas após o contato com o extrato de própolis, os três isolados deixaram de produzir a referida enzima e oito dos 11 isolados mantiveram-se não produtores. *C. guilhermondii* (4/4) não produziram esta enzima, e este comportamento se manteve mesmo após o contato com o extrato de própolis. Quatro isolados sugestivos de *C. dubliniensis* não foram produtores;

**Tabela.** Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis e digluconato de clorexidina sobre as leveduras isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em UTI

Amostras: 72 Isolados	*Extrato etanólico de Própolis	**CFM 90- do Extrato etanólico de Própolis	*Digluconato de clorexidina	**CFM 90 do Digluconato de clorexidina
<i>C. albicans</i> - 53 isolados	100% inibição (53/53)	5%	88,7% inibição (47/53)	0,0018%
<i>C. tropicalis</i> - 11 isolados	90,9% inibição (10/11)	20%	81,8% inibição (09/11)	0,00012%
<i>C. guilhermondii</i> - 04 isolados	100% inibição (04/04)	0,63%	100% inibição (04/04)	0,0018%
Sugestiva de <i>C. dubliniensis</i> - 04 isolados	100% inibição (04/04)	0,31%	100% inibição (04/04)	0,00375%

\*Pesquisa de Concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 24; resultados em porcentagem

\*\*Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas; resultado em porcentagem

CFM 90 de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados

mas passou a produzi-los após o contato com o extrato de própolis (25%).

A produção de fosfolipase por *C. albicans* ocorreu em 71,70% (38/53) dos isolados e após o contato com o extrato de própolis, a produção desta enzima foi inibida em 81,57% (31/38) isolados. Sete (18,43%) isolados mantiveram a produção de fosfolipase, e oito (15,10%) isolados foram altamente produtores. E após o contato com o extrato de própolis deixaram de produzi-la e um isolado não-produtor passou a ser produtor.

Dos 11 isolados de *C. tropicalis*, oito (72,72%) foram produtores dessa enzima; e após o contato com o extrato de própolis, todas deixaram de produzi-la. O mesmo fato ocorreu com os isolados de *C. guilhermondii* (4/4) e com as cepas sugestivas de *C. dubliniensis* (4/4).

Após o contato de *C. albicans* com a clorexidina, 73,10% (19/26) dos isolados mantiveram-se produtores, oito (30,76%) deixaram de produzir e um isolado diminuiu a produção. Em *C. tropicalis*, 27,27% (3/11) foram produtores, e após o contato com a clorexidina 66,66% (2/3) deixaram de produzir e um manteve a produção de proteinase. Para *C. guilhermondii*, os quatro (100%) isolados não produtores passaram a produzir, após o contato com a clorexidina. Para as sugestivas de *C. dubliniensis*, 100% (4/4) não produziram esta enzima e assim se mantiveram após o contato com a clorexidina.

A produção de fosfolipase ocorrida após o contato de *C. albicans* com a clorexidina, 36,84% (14/38) dos isolados deixaram de produzir esta enzima, 63,16% (24/38) mantiveram a produção, quatro isolados altamente produtores deixaram de produzir e um considerado não-produtor passou a produzir. Quanto aos 11 isolados de *C. tropicalis*, após o contato com a clorexidina, 62,50% (5/8) deixaram de produzir, 25% (2/8) aumentaram a produção e um passou a produzir esta enzima. Os quatro (100%) isolados de *C. guilhermondii* mantiveram a sua produção, mesmo após o contato com a clorexidina. Dos quatro (100%) isolados das amostras sugestivas de *C. dubliniensis*, 50% (2/4) mantiveram a produção e 50% (2/4) aumentaram a produção de fosfolipase após o contato com a clorexidina.

A produção de franjas foi também estudada antes e após o contacto com o extrato etanólico de própolis e digluconato de clorexidina. Antes do

maior número de pacientes infectados por fungos e hospitalizados. Contudo, as espécies de *Candida não-albicans* tornaram-se importantes no acometimento desta infecção em indivíduos com sistema imunológico comprometido<sup>23</sup>.

*C. albicans* são difíceis de erradicar, uma vez que estas leveduras podem apresentar resistência à maioria dos antifúngicos atualmente utilizados<sup>24</sup>.

As leveduras são de ocorrência comum na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo *C. albicans* a espécie predominante na microbiota da boca, a qual corresponde à proporção de 60 a 70% do total de isolamento, seguida pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*<sup>25</sup>.

As dificuldades relacionadas ao tratamento das candidíases, associadas ao controle de infecções, são fatores importantes para a descoberta de novos agentes antifúngicos, com amplo espectro de atividade anti-*Candida* e no combate de isolados resistentes às drogas já em uso.

A investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, motivados principalmente pelo aumento da resistência microbiana aos agentes antimicrobianos tradicionais e aos efeitos adversos<sup>26</sup>.

Atualmente, inúmeros produtos para higiene bucal e controle da microbiota bucal encontram-se disponíveis no mercado. E cabe aos profissionais de saúde e às pessoas responsáveis pela aquisição destes produtos em procurar informações dentro da ampla literatura existente sobre sua eficácia, posologia e principalmente a indicação.

Novos compostos naturais foram investigados para mudar este quadro, como os produtos derivados de plantas que podem agir como antifúngicos<sup>27,28</sup>, bem como os opoterápicos e os óleos essenciais que são substâncias aromáticas, voláteis e hidrofóbicas<sup>29</sup>.

No presente estudo utilizou-se o extrato etanólico de própolis até a concentração de 20% e o digluconato de clorexidina até a concentração de 0,12%, para avaliar *in vitro* a atividade antifúngica sobre *C. albicans* e *não-albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em UTI. Apesar de estes produtos apresentarem reconhecida atividade antimicrobiana, sua utilização para uma possível higiene bucal nesses pacientes ainda não havia sido realizada. Para tanto, foram inicialmente efetuados o isolamento e os testes de sensibilidade para leveduras

em função de sua reconhecida resistência. A escolha desses produtos se deu pela fácil aquisição, baixo custo e poucos efeitos colaterais.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a própolis é um produto natural, de características físicas resinosas e de composição variável, coletada de várias espécies vegetais em adição às secreções da abelha. E esta é classificada como medicamento opoterápico. Os requisitos para realizar o seu registro estão definidos na RDC nº 132/2003.

Esta agência relata que o mencionado produto pode ser utilizado na concentração máxima de 20%.

A composição química da própolis inclui basicamente 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E<sup>30</sup>. Os principais grupos químicos são flavonóides, terpenóides e fenilpropanóides<sup>31</sup>. A presença de diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam a grande variedade das propriedades terapêuticas da própolis<sup>32</sup>.

Ota et al<sup>33</sup> testaram a sensibilidade de *C. albicans* ao extrato etanólico de própolis, e observaram que as concentrações fungicidas mínimas contra os 15 isolados avaliados foi de 1,56%, o que mostrou o seu uso na prevenção de doenças bucais. Em 2001, estes mesmos autores avaliaram o efeito *in vitro* do extrato etanólico de própolis sobre 80 espécies de leveduras do gênero *Candidae*, e observaram que todas as cepas eram sensíveis a este extrato.

O extrato etanólico de própolis tem mostrado ação fungicida sobre as espécies como *C. albicans*, *C. parapsiloses*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii*, *C. cruzei*, *C. glabrata*, *C. lusitanea*, *C. stelladoidea*, *Sacaromyces cerevisiae*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*<sup>34,35</sup>.

Santos et al<sup>36</sup> utilizaram o extrato etanólico de própolis a 10% e 20% e demonstraram a atividade antifúngica e antibacteriana nestas concentrações. Gomes et al<sup>37</sup> observaram que as cepas de *Candida* foram sensíveis a própolis nas concentrações de 5, 10, 15 e 20%.

Resultados semelhantes foram detectados no presente estudo, quando o extrato etanólico

de própolis inibiu o crescimento de 100% (53/53) dos isolados de *C. albicans*, *C. guilhermondii* (4/4) e as cepas sugestivas de *C. dubliniensis* (4/4) até a concentração de 20%. Para os isolado de *C. tropicalis*, a inibição ocorreu em 90,9% (10/11). A concentração fungicida mínima que inibiu 90% dos isolados pelo extrato etanólico de própolis foi de 5% para *C. albicans*, 20% para *C. tropicalis*, 0,625% para *C. guilhermondii* e de 0,312% para as sugestivas de *C. dubliniensis*.

Ota et al<sup>38</sup> relataram que apesar da ação antibacteriana da própolis estar bem estabelecida na literatura, pouco se mencionasuaação antimicrobiana sobre as leveduras; e a própolis foi efetiva sobre *C. albicans*, mesmo em concentrações mais diluídas.

A composição da própolis varia de acordo com as plantas encontradas na região da colmeia. Na Europa e América do Norte as substâncias são principalmente extraídas de árvores da espécie *Populus*. Em regiões tropicais, essa espécie não é nativa. Neste caso, as abelhas encontram outras plantas para efetuar a coleta de substâncias que tenham ação antimicrobiana similar. Esta ocorrência é de suma importância para a sobrevivência da colmeia e a atividade antimicrobiana da própolis deve ser atribuída ao conjunto dos seus componentes<sup>39</sup>.

Schett<sup>32</sup> correlacionou à atividade antimicrobiana do extrato de própolis de diversas regiões brasileiras com a quantidade de flavonóides, e observaram que o poder da ação antimicrobiana é diretamente proporcional à quantidade dessa substância.

Junior et al<sup>40</sup> avaliaram a atividade *in vitro* de extrato etanólico de própolis, produzido em três diferentes regiões, sobre cinco espécies de microrganismos como *C. albicans*. Os autores detectaram a ocorrência de diferença estatística da Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre os três extratos.

A clorexidina é um composto que, na sua estrutura, contém dois anéis clorofenólicos e dois bis-biguanida ligados simetricamente por meio de cadeias de hexametil. Esta bis-biguanida é uma base forte, com carga positiva, praticamente insolúvel em água. Por isto o seu uso na área de Odontologia

é preconizado em forma de sal digluconato, para proporcionar maior solubilidade à substância. Possui a propriedade de “substantividade” (retenção), pois permanece ativa e retida no local de ação (superfície dental, gengiva e mucosa bucal), e é liberada lentamente, para evitar que seu efeito seja rapidamente neutralizado<sup>41</sup>. É um agente químico de amplo espectro antimicrobiano, utilizado para efetuar a manutenção da saúde gengival e no tratamento da gengivite<sup>42,43</sup>.

Quando absorvida, a clorexidina é rapidamente metabolizada no fígado, sendo excretada nas fezes pela bile. Em um estudo com ratos, 20% da dose de clorexidina marcada foram encontradas nos animais até cinco dias após o seu uso<sup>42</sup>.

Segundo Batista et al<sup>42</sup>, esta substância em baixas concentrações tem efeito bacteriostático e fungistático; e em altas concentrações tem ação bactericida e fungicida, provocando lise celular. Esta atividade é reduzida na presença de altas concentrações de soro, proteína, sangue e outros compostos orgânicos.

A clorexidina foi introduzida na Odontologia há mais de quarenta anos como soluções para enxaguar bocas, e apresenta ação de largo espectro contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. Tem sido utilizada em diferentes fórmulas para o controle da placa dental. No Brasil, ela é frequentemente encontrada em soluções de enxague bucais na concentração de 0,12%, e também pode ser usada na concentração de 0,20%<sup>43</sup>.

Há estudos que demonstraram a eficácia do digluconato de clorexidina a 0,12% na redução e na formação do biofilme bucal. Nesta concentração há redução dos efeitos adversos causados pela substância, quando em concentrações mais elevadas. Entretanto, o uso diário desta solução pode apresentar efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal. Por isso, outras formulações têm sido desenvolvidas para melhorar estes aspectos, e mantendo-se o adequado controle da formação do biofilme bucal. Neste sentido, a associação do xilitol com a clorexidina tem sido recomendada<sup>44</sup>.

Este produto pode ter finalidade profilática e/ou terapêutica, em forma de solução para bochechos, verniz, gel, irrigação sub-gengival, dispositivos intra-orais de liberação lenta, entre outros veículos. Tem sido utilizada como padrão em relação a outros agentes antimicrobianos para antisepsia bucal<sup>43-45</sup>.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica o uso de digluconato de clorexidina, no formato de veículo bucal, a 0,12% ou a 0,20%, como uma das medidas recomendadas para a prevenção de pneumonias hospitalares e de mortalidade associada à ventilação mecânica. Esta medida tem o objetivo de erradicar a colonização bacteriana da orofaringe e reduzir a ocorrência de pneumonia associada à ventilação mecânica<sup>46</sup>.

O digluconato de clorexidina tem sido ativo contra bactérias e leveduras, segundo Candido et al<sup>47</sup>, e é um fato que foi confirmado no presente estudo. No trabalho de Candido et al<sup>47</sup>, todas as cepas de *C. albicans* avaliadas foram sensíveis ao digluconato de clorexidina a 0,12% na concentração de 1,56%. No entanto, Ferguson et al<sup>48</sup> ao avaliarem a efetividade do digluconato de clorexidina a 0,20% sobre *C. albicans*, observaram que a concentração inibitória mínima para a levedura foi menor do que 0,19%.

O digluconato de clorexidina inibiu o crescimento de 88,7% (47/53) dos isolados de *C. albicans*, 100% dos isolados de *C. guilhermondii* (4/4) e de sugestivas de *C. dubliniensis* (4/4) até a concentração de 0,12%. Para os isolado de *C. tropicalis* a inibição ocorreu em 81,8% (9/11).

A concentração fungicida mínima que inibiu 90% dos isolados pelo digluconato de clorexidina foi de 0,0018% para *C. albicans*, 0,012% para *C. tropicalis*, de 0,0018 % para *C. guilhermondii* e de 0,00375 % para as sugestivas de *C. dubliniensis*.

As leveduras, como muitos micro-organismos patogênicos, possuem fatores de virulência que têm um papel essencial na evolução do processo infeccioso. Entre os principais fatores de virulência estão a produção de enzimas extracelulares, a produção e a extensão de franjas marginais, e na topografia das colônias. Mas não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito da própolis e

da clorexidina sobre esses fatores de virulência.

Diante dos resultados obtidos e nas condições em que foi conduzido o presente estudo, pode-se concluir que os isolados de leveduras foram sensíveis ao digluconato de clorexidina até a concentração de 0,12% e o extrato etanólico de própolis até a concentração de 20%. O extrato etanólico de própolis inibiu 80,56% das leveduras isoladas até a concentração de 5%. A produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e a produção de franjas foram inibidas nas concentrações sub-inibitórias do digluconato de clorexidina e do extrato etanólico de própolis.

Apesar dos índices de inibição do digluconato de clorexidina tenham sido menores do que aqueles encontrados no extrato etanólico de própolis, a própolis torna-se viável pelo fato de ser um produto de origem natural. E o uso diário não causa efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal.

Espera-se que o presente estudo venha contribuir com mais um produto natural com atividade antifúngica sobre as leveduras do gênero *Candida*.

## REFERÊNCIAS

1. Boonyasiri A, Jearanaisilavong J, Assanasen J. Candidemia in Siriraj Hospital: epidemiology and factors associated with mortality. *J Med Assoc Thai*. 2013;96(Suppl 2):S91-7.
2. Pupulin ÁR, Carvalho PG, Nakamura CV. Susceptibility to antifungal and enzyme production by *Candida* yeasts isolated from HIV/AIDS patients. *Salud(i)Ciencia*. 2014; 20(5):471-6.
3. Sears D, Schwartz BS. *Candida auris*: an emerging multidrug-resistant pathogen. *Int J Infect Dis*. 2017;63:95-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.08.017>
4. Gonçalves PE, Rodrigues NALR, Seixas FL. Ações de promoção de saúde bucal no âmbito hospitalar. *Rev. Ciênc. Méd., Campinas*. 2014; 23(1):15-23. <https://dx.doi.org/10.24220/2318-0897v23n1a2411>
5. Martins ST, Moreira M, Furtado GHCF, Marino CGJ, Machado FR, Wey SB et al. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3):331-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000300017>
6. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(3):272-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000300004>
7. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(1):108-13. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>
8. Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PloS Pathog*. 2013;9(9):e1003625. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>
9. Heizmann P, Klefisch F, Heizmann WR. Basic research - Significance of detection and clinical impact of *Candida albicans* in non-immunosuppressed patients. *Pharmacol Pharm*. 2011;2:354-60.
10. Khan MS, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2012;50(1):33-42. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.582890>
11. López-Montéon A, Gómez-Figueroa FS, Ramos-Poceros G, Guzmán-Gómez D, Ramos-Ligonio A. Codetection of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* by PCR in urine samples in a low-risk population attended in a clinic first level in central Veracruz, Mexico. *BiomeRes Int*. 2013;2013:281892. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/281892>

12. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement. Alternat Med*. 2005;2(1):33-8. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh060>
13. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(1):1-14. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
14. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15(7):561-71.
15. Oliveira LC, Carneiro PP, Fischer RG, Tinoco EM. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2007;19(4):428-33.
16. Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(3):262-73. <https://dx.doi.org/doi:10.1007/s12016-012-8322-2>
17. Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Ver Braz Farmacon*. 2008;18(1):84-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100016>
18. Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz J Microbiol*. 2002;33(4):365-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400018>
19. Huang M, Kao KC. Population dynamics and the evolution of anti fungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;333(2):85-93. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02587.x>
20. Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1982; 20(3):233-44.
21. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1982;20(1):7-14.
22. Hunter PR, Fraser CA. M. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1989;27(10):2156-60. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/27/10/2156.full.pdf>
23. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599-07 <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000500010>
23. Budzýńska A, Sadowska B, Lipowczan G, Maciag A, Kalemba D, Rózalska B. Activity of selected essential oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of new aspects of their specific pharmacological properties, with special reference to lemon balm. *Adv Microbiol*. 2013;3(4):317-25. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.34045>
25. Williams D, Lewis D. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3:5771. <https://dx.doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>
26. Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1):1-9. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.047>
27. Abrantes MR, Lima EO, Medeiros MAP, Menezes CP, Guerra FQS, Milan EP. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não-albicans. *Rev Bras Farm*. 2013;94(3):227-33. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-v94n3-05.pdf>
28. Santana DP, Ribeiro TF, Ribeiro EL, Aquino GLB, Naves PLF. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2015;36(1):83-90. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <http://seer.fcfa.unesp.br/rcfba/index.php/rcfba/article/view/211/119>
29. Matsuzaki Y, Tsujisawa T, Nishihara T, Nakamura M, Kakinoki Y. Antifungal activity of chemotype essential oils from rosemary against *Candida albicans*. *Open J Stomatol*. 2013;3:176-82. <http://dx.doi.org/10.4236/ojst.2013.32031>

30. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(3):313-6. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem059>
31. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda MC, Carvalho MA, Farias LM, Moreira ESA et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol*. 2002;80:1-7. [https://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00003-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00003-X)
32. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(12):1361-6. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x>
33. Ota C, Valente PHM, Unterkicher CS, Shimizu MT. Atividade da própolis sobre bactérias isoladas da cavidade bucal. *LECTA, Bragança Paulista*. 1998;16:73-7.
34. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol*. 2005;99(1):69-73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
35. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):493-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500002>
36. Santos VR, Gomes RT, Mesquita RA, Moura MD, França EC, Aguiar EG et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res*. 2008;22(11):1544-7. <https://dx.doi.org/10.1002/ptr.2541>
37. Gomes RT, Teixeira KIR, Cortés ME, Santos VR. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. *Braz J Oral Sci*. 2007;6(22):1387-91. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/bjos/article/view/8642997>
38. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*. 2001;44(9-10):375-8.
39. Parker JE, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:102-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>
40. Fernandes Junior A, Lopes MR, Colombari V, Monteiro AV, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Cienc Rural [online]*. 2006;36(1):294-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000100047>
41. Araujo MTB, Araujo RPC, Campos EJ. Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade bactericida da clorexidina 0,12% e 0,2% e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplax. *Rev Odonto Ciênc*. 2001;16(33):187-201.
42. Batista AL, Lins RD, Coelho RS, Barbosa DN, Belém NM, Celestino FJA. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. *Complement Ther Clin Pract*. 2014;(20):93-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2013.08.002>
43. Simões RCS, Merlini SP, Silva RPR, Bastos RS, Torres AS, Bastos JRM. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. *Rev Bras Odontol*. 2011;68(1):91-4.
44. Souza ELC. Comparação do digluconato de clorexidina 0,12% sem xilitol com álcool e com xilitol sem álcool para controle do biofilme oral e efeitos adversos associados. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Veiga de Almeida; 2007.
45. Hortense SR, Carvalho ES, Carvalho FS, Silva RPR, Bastos JRM, Bastos RS. Uso de clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. *Rev Odontol Univ Cidade de São Paulo*. 2010;22,(2):178-84.
46. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 24 de fevereiro de 2010. Dispõe sobre os requisitos

- mínimos para funcionamento de Unidades de Terapia Intensiva e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2010. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0007\\_24\\_02\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0007_24_02_2010.html)
47. Candido RC, Azevedo RVP, Ito IY. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Cepacol, Malvona e Periogard, Frente *C. albicans* Isoladas da Cavidade Bucal. *Rev. Odontol. UNESP*. 1996;25(1):79-84. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <http://www.revodontolunesp.com.br/article/588017787f8c9d0a098b4742>
48. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod*. 2002;28(2):68-71. <https://dx.doi.org/10.1097/00004770-200202000-00004>