

RAFAEL GUERRA LUND

**ISOLAMENTO DE ESPÉCIES DE *Candida* EM PACIENTES COM
CANDIDÍASE ATRÓFICA CRÔNICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE DUAS ESPÉCIES DE *Mikania***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obter o título de Doutor em Ciências (área de concentração em Dentística).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Co-orientadores: Prof. Dr. Gladis Aver Ribeiro

Prof. Dr. Pedro Luis Rosalen

Pelotas, 2008

Banca examinadora

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino Ana Paula Neutzling

Profa. Dra. Ana Paula Neutzling

Prof. Dra. Ezilmara Rolim de Sousa

Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Prof. Dr. Rogério Freitag

Profa. Dra. Adriana Piva (Suplente)

Prof. Dra. Sandra Tarquínio (Suplente)

Resumo

Lund, Rafael Guerra. **Isolamento de espécies de *Candida* em pacientes com Candidíase Atrófica Crônica e atividade antimicrobiana de duas espécies de *Mikania***. 2008. 110f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Uma variedade de doenças envolve a cavidade oral, dentre elas, a cárie dental e a candidíase, sendo que a primeira é considerada a mais prevalente em todo o mundo. Atualmente está bem estabelecido que cárie dental é uma doença multifatorial infecto-contagiosa associada a bactérias patogênicas residentes do biofilme dental. Estes microrganismos são os responsáveis pela produção de ácidos que levam à desmineralização do esmalte dental. As infecções por *Candida* consistem atualmente num problema de Saúde Pública. Isto se deve ao aumento de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de hospedeiros imunodeprimidos de modo geral, bem como ao tratamento prolongado com antibacterianos o que contribui para o desequilíbrio da microbiota. Assim, o uso de agentes antimicrobianos eficientes contra bactérias e leveduras é um importante meio de controle destas infecções bucais. Vários agentes antimicrobianos de origem natural estão sendo investigados devido as suas possíveis propriedades farmacológicas. As plantas do gênero *Mikania*, conhecidas popularmente como “guaco”, destacam-se entre os produtos naturais com notáveis propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatórias e antineoplásicas. Neste estudo foram avaliados extratos etanólicos brutos de duas espécies de *Mikania* (*Mikania glomerata* – Mg e *Mikania hirsutissima* – Mh) que foram pré-selecionadas com base na etnobotânica (conhecimento popular) e levantamento bibliográfico sobre as espécies a serem estudadas e suas congêneres. O teste foi realizado em *Streptococcus* do grupo mutans através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), Concentração Bactericida Mínima (MBC) e inibição da aderência em superfície de vidro (Adh). Durante o período de um ano também foram estudados os pacientes usuários de prótese com lesões compatíveis com Candidíase Atrófica Crônica (CAC) encaminhados ao Centro de Diagnóstico de Doenças da boca. Foi aplicado um questionário para cada paciente, com informações referentes à sua identificação, dados demográficos, história médica e comportamento (hábitos de higiene e uso da prótese). Também foi realizado o exame intra-oral, onde eram avaliadas as variáveis: aparência e extensão da lesão de estomatite. A coleta microbiológica foi realizada com a fricção de swab estéril na mucosa com lesão compatível com CAC. Estas amostras foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose com 100mg/mL de cloranfenicol e incubadas a 37°C por 24-48h. A identificação presuntiva de espécies de *Candida* foram baseadas nas características macro e micromorfológicas, realização de microcultivo, teste em caldo hipertônico e CHROMagar. A maioria dos casos de CAC apresentou isolamento da levedura. As lesões de CAC foram mais frequentes em mulheres, com prótese total com uso há mais de 10 anos. A CIM frente a *Streptococcus mutans* UA159 foi 44,45µg/mL (Mg) e 88,90µg/mL (Mh), e a CBM foi 88,90µg/mL (Mh). Frente a *Streptococcus sobrinus* 6715, a CIM foi 22,23µg/mL (Mh) e 88,90µg/mL (Mg), e a CBM foi 177,80 µg/mL (Mh). A aderência celular também foi inibida em concentrações de 20µg/mL (Mh) e 40µg/mL (Mg). Estes resultados são informações de base para o uso potencial das duas espécies de *Mikania* contra *Streptococcus* do grupo *mutans*, necessitando outros estudos envolvendo os princípios ativos do extrato alcoólico de *Mikania*.

Quanto ao isolamento de *Candida* em pacientes com diagnóstico clínico de Candidíase Atrófica Crônica: 1) os resultados não confirmam uma diferença significativa em pacientes com diagnóstico clínico de estomatite por dentadura com relação à presença ou ausência da levedura; 2) a ocorrência de *Candida* em pacientes com diagnóstico clínico de Candidíase atrófica Crônica foi negativamente relacionado a importantes fatores associados a esta infecção oportunista; e 3) os achados micológicos do presente estudo não indicaram que as variáveis investigadas tinham um efeito significativo na infecção oral por *Candida albicans* ou outras espécies do gênero *Candida*.

Palavras-chave: fitoterapia; agentes antimicrobianos; candidíase oral; estomatite por dentadura, *Candida*, cárie

Abstract

Lund, Rafael Guerra. **Isolation of *Candida* species from patients with Chronic Atrophic Candidiasis and antimicrobial activity of two species of *Mikania***. 2008. 110f. Tesis (Doctorate) – Postgraduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas.

A great variety of diseases can affect the oral cavity, such as dental caries and candidosis, being the first one considered the most prevalent oral diseases worldwide. The multifactorial and infect-contagious characteristics of dental caries has been established, associated with resident bacterial pathogens of dental biofilm. These microorganisms are responsible by the production of acids and citotoxic products, which could promote the demineralization of dental structure. Currently, *Candida* infections constitute an important problem in Public Health. Such findings is basically due to the technological advancements of Medicine, increasing in AIDS infection and immune depressed patients in general, using prolonged antimicrobials therapies, which contributes to the microbial disequilibrium. Therefore, the use of efficient antimicrobial agents against pathogenic bacteria and yeasts is an important tool in the control of these infective diseases. Several natural antimicrobial agents are been investigated because of their possible pharmacological properties. Plants of genus *Mikania* are pointed out as natural products with noticeable antibacterial, antifungicidal, anti-inflammatory and antineoplastic properties. In this study the potential effect of two *Mikania* species was evaluated (*Mikania glomerata* – Mg e *Mikania hirsutissima* – Mh) using their crude ethanol extracts, based on the ethnobotanics (popular knowledge) and the literature. The test against mutans streptococci was assessed by the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and inhibition of cell adherence to a glass surface (Adh). Also during a period of one year denture wearer patients with lesions compatible with Chronic Atrophic Candidiasis and assisted in the Center of Diagnosis of Mouth Diseases (CDMD), were investigated. It was applied a questionnaire including the identification of the subject, demographic, medical history and behaviour (oral hygiene and prosthesis wear). It also was carried out a intra-oral exam, where appearance and extension of the stomatitis lesion were evaluated. The microbiological collect was carried out frictioning sterilized swabs in the palate's mucosa, tongue or both of them. The samples were seeded in Agar Sabouraud Dextrose with 100mg/mL of chloramphenicol and they were incubated at 37°C for 24-48h. The presumptive identification of *Candida* species was based on the morphologic characteristics, Gram colorization of the yeasts, microculture test, hypertonic broth test and it was confirmed by the CHROMagar. The MIC against *Streptococcus mutans* UA159 was 44.45 µg/mL (Mg) and 88.90 µg/mL (Mh), and the MBC was 88.90 µg/mL (Mh). Against *Streptococcus sobrinus* 6715, the MIC was 22.23 µg/mL (Mh) and 88.90 µg/mL (Mg), and the MBC was 177.80 µg/mL (Mh). The celular adherence also was inhibited at concentrations of 20 µg/mL(Mh) and 40 µg/mL (Mg). These results provide promising baseline information for the potential use of two species of *Mikania* against mutans streptococci. These findings warrant more-in-depth studies of the active principles of this *Mikania* ethanol extracts. With regard to *Candida* isolation with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis: 1)the results did not confirm a significant difference between patients with clinical diagnosis of denture stomatitis concerning the presence or absence of yeasts; 2) the occurrence of *Candida* in patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic

Candidiasis was negatively related to important factors associated to this opportunistic infection; and 3) mycological findings from the present study do not indicate that the covariates investigated have a significant effect on oral infection by *Candida albicans* or other species of *Candida* genus.

Keywords: phytoterapy; antimicrobial agents; oral candidiasis; denture stomatitis, *Candida* sp, caries.

Lista de Figuras

Figura 1 – The minimum concentration of <i>M. glomerata</i> and <i>M. hirsutissima</i> ethanol extracts capable of inhibiting the adherence of growing <i>S. mutans</i> UA159 and <i>S. sobrinus</i> 6715 cells.....	82
--	-----------

Lista de Tabelas

Table 1 – Inclusion and exclusion criteria.....	68
Table 2 - Sample distribution and prevalence of <i>Candida</i> isolates from patients with clinical diagnosis of denture stomatitis and <i>Candida</i> species according to the covariates.....	69
Table 1 – Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values (n=9) of ethanol extracts of <i>M. glomerata</i> and <i>M. hirsutissima</i> against <i>S. mutans</i> UA159 and <i>S. sobrinus</i> 6715.....	81

Lista de abreviaturas

%	Percentual
°C	graus Celsius
[]	Concentração
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
DO	Densidade Óptica
et al.	e outros
Fig.	Figura
FO	Faculdade de Odontologia
G	Grama
H	Hora
IB	Instituto de Biologia
λ	Comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
μm	Micrometro
mg/mL	miligramas por mililitro
Min	Minuto
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
mol L^{-1}	mol por litro ou molar
N	número de espécimes
pH	potencial de hidrogênio iônico
p/v	peso por volume
S	Segundo
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
v/v	volume por volume
X	Vezes
UFC	Unidades formadoras de colônias

Sumário

Tese - Isolamento de *Candida* em pacientes com Candidíase Atrófica Crônica e atividade antimicrobiana de duas espécies de *Mikania*.

Resumo	3
Abstract	5
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	8
Lista de abreviaturas	9
1 Introdução Geral	11
2 Projeto de Pesquisa: Atividade antimicrobiana e antineoplásica de alguns produtos naturais	16
3 Revisão de Literatura	38
4 Relatório do Trabalho de Campo	47
5 Artigo 1 - Occurrence, isolation and differentiation of <i>Candida</i> sp. in patients with clinical manifestations of Chronic Atrophic Candidiasis and prevalence of variables associated to this opportunistic infection.....	52
6 Artigo 2 - <i>In vitro</i> inhibitory effects of two <i>Mikania</i> (Asteraceae) species on bacterial viability and cell adherence of mutans streptococci.....	71
7 Conclusões	84
8 Referências	85
Anexos	93

1 Introdução Geral

A cavidade bucal, de modo similar a outros sítios do corpo humano apresenta uma microbiota natural com composição característica que na maioria das vezes coexiste de modo harmônico com o hospedeiro. Entretanto, a maioria dos indivíduos sofre, em algum período de sua vida, episódios localizados de doença bucais causados por um desequilíbrio na composição da microbiota bucal residente (MARSH, 1992). As manifestações clínicas deste desequilíbrio, que incluem a cárie dental e a candidíase atrófica crônica são endêmicas em sociedades industrializadas e estão aumentando em países em desenvolvimento, como o Brasil (COELHO et al., 2004; FREITAS et al., 2008).

Na década de 30 do século XX, eram raras as doenças associadas às espécies de *Candida*, e a candidíase sistêmica era praticamente desconhecida. Na atualidade, a candidíase superficial está entre as infecções mais comuns da pele e mucosas, e tanto a candidíase superficial como profunda são problemas de Saúde Pública. Isto se deve ao aumento de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), de hospedeiros imunodeprimidos de modo geral, devido ao tratamento prolongado com antibacterianos contribuindo assim para o desequilíbrio da microbiota. Desta forma, o indivíduo passa do estado de portador à doente (PAULA, 1998). A candidíase oral apresenta quatro formas básicas de manifestação clínica, segundo classificação de Neville et al. (2002). Um delas é a candidíase aguda pseudomembranosa, que se manifesta quando há uma baixa na imunidade do paciente e se apresenta como placas brancas, podendo aparecer na língua, no palato e na bochechas, com aspecto semelhante ao de leite coalhado; estas são facilmente removíveis. Se não for tratada adequadamente, esta lesão pode se espalhar pela boca e garganta, indo para esôfago e chegando até o estômago e pulmões. A mucosa abaixo das lesões apresenta-se avermelhada. Outra forma é a candidíase atrófica aguda, que mostra uma área de ulceração rasa e extensa, sem presença de membrana aparente, muito dolorosa e com sensação de queimação. A candidíase atrófica crônica, também conhecida como “estomatite por dentadura”, é caracterizada por eritema localizado crônico dos tecidos cobertos pela dentadura. Já a candidíase crônica hiperplásica, também denominada leucoplásica é caracterizada por apresentar placas brancas que não se destacam, semelhantes à leucoplasia (Neville et al., 2002).

Atualmente está bem estabelecido que cárie dental também é uma doença infecciosa associada a um grupo de microrganismos. Estes microrganismos formam um biofilme patogênico que se adere sobre a superfície dental, de modo a produzirem ácidos e produtos citotóxicos que levam, respectivamente, a desmineralização do esmalte dental e inflamação gengival (MOSADOMI, 1987). Este biofilme é genericamente conhecido como placa dental. A placa dental que se forma sobre a superfície do dente apresenta uma composição microbiana e bioquímica variável, podendo mudar de modo a tornar este biofilme patogênico (MOSADOMI, 1987; OSAWA et al., 1992). Assim, fatores que levam ao desequilíbrio da comunidade microbiana de modo a favorecer o crescimento de bactérias odonto ou periodontopatogênicas, vão direcionar para o surgimento de uma placa dental relacionada à cárie dental e doença periodontal (OSAWA et al., 1992).

Um dos fatores de desequilíbrio fundamental para o aparecimento de uma placa dental cariogênica é a dieta rica e freqüente em carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo *mutans*, como *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, uma vez que estes microrganismos apresentam vantagens ecológicas quando da presença de sacarose no meio bucal (NAPIMOGA et al., 2005; BARBIERI et al., 2007).

Os estreptococos do grupo *mutans*, além de serem acidogênicos e acidúricos, não só fermentam a sacarose como a partir desta sintetizam polissacarídeos extracelulares (IKENO; IKENO; MIYASAWA, 1991; ISRAELSON, 1991). Esta síntese é feita por enzimas chamadas genericamente de glucosiltransferases que facilitam a aderência dos estreptococos do grupo *mutans*, permitindo assim o seu acúmulo sobre a superfície lisa do esmalte dental. Inicia-se, assim, a formação da placa dental relacionada à cárie (NAPIMOGA et al., 2005).

Deste modo, o uso de agentes antimicrobianos eficientes contra estes patógenos bucais pode ser importante na prevenção da cárie dental (OSAWA et al., 2002; WU-YAN; CHEN; WU, 1988; YATSUDA et al., 2005).

Nas últimas décadas tem sido observado mundialmente, um crescente uso de produtos naturais para a prevenção de doenças bucais devido as suas possíveis propriedades farmacológicas, principalmente antimicrobianas (CAI; WU, 1996; LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1977; MARCOTE; LAVOIE, 1998; PEREIRA et al., 1994; PHILLIPS, 1991; WU-YUAN; GREEN; BIRCH, 1990). Assim, a descoberta de novos produtos naturais com atividade antibacteriana e talvez com menor efeito adverso,

seria muito importante para obtenção de um meio efetivo de controle da formação da placa dental patogênica. Porém, para avaliar a efetividade da atividade biológica são necessárias análises progressivas começando com estudos laboratoriais *in vitro*, passando por modelos de estudo *in vivo* e culminando com os estudos clínicos longitudinais (WU-YUAN; CHEN; WU, 1988; VARGAS et al., 2007).

A *fitoterapia* consiste na prática do uso de plantas ou de suas partes com finalidade terapêutica (MACIEL et al., 2002). Quem iniciou o uso de fitoterápicos foram os chineses no ano 3000 a.C. Hoje, a Alemanha é um dos principais países precursores do uso de fitoterápicos (70% dos profissionais prescrevem fitoterápicos nos serviços de saúde) (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Políticas públicas para implantação de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) já foram discutidas e, muito em breve, favorecerão o processo de municipalização da Saúde visto que, apesar da evolução da Medicina alopática a partir da metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalar até a obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A *etnofarmacologia* é a ciência que estuda todos os produtos de origem animal ou vegetal de uso popular. *Fitofármacos* são medicamentos à base de plantas que contêm o princípio ativo isolado, ou seja, que contêm uma substância medicamentosa isolada a partir de extratos de plantas. Logo, *fitoterápico* consiste no uso de toda a planta, enquanto que *fitofármaco* refere-se apenas ao princípio ativo da planta (BRASIL, 2004; MACIEL et al., 2002).

Os estudos etnofarmacológicos no Brasil buscam fundamento nas tribos indígenas (Ex.: Waimiri, Atoari, Caiapós, Buritis, Yanomami), nos caboclos, populações da Amazônia e comunidades da zona rural (MACIEL et al., 2002).

O programa de investigação dos produtos naturais baseia-se fundamentalmente no conhecimento popular, a partir de entrevistas com “velhos”, “curandeiros”, “ervateiros”. Também são utilizados questionários para obter informações relacionadas ao número de plantas, coleta, período, partes da planta utilizada, nome popular, formas de utilização, coleta da amostra com o usuário, identificação taxonômica e processamento dos dados (MACIEL et al., 2002).

Quanto ao produto natural, é necessário obter-se informações da Medicina popular; realizar pesquisa bibliográfica; extrair informações botânicas, taxonômicas e químicas; analisar fatores ambientais (local da coleta, época, etc.); verificar se é ativo farmacologicamente; realizar estudo etnofarmacológico; e identificar quando este composto é utilizado. Quando o produto natural é selecionado, são realizados ensaios farmacológicos e toxicológicos para confirmar sua atividade. Após, verifica-se se a substância ativa é conhecida, se existe faixa de concentração/dose para uso e a sua toxicidade (BOMBARDELLI; BOMBARDELLI, 2005; BRASIL, 2004; MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Um produto natural pode ser um organismo inteiro (planta ou animal) ou parte de um organismo (flores, folhas, raízes, glândulas). A procura de novas substâncias torna-se necessária à medida que $\frac{2}{3}$ das doenças esperam tratamentos satisfatórios e surgem cepas resistentes.

Existem várias formas de preparo de fitoterápicos, dentre as quais merecem destaque: infusão, decocção, maceração, xarope, compressa, cataplasma, pedilúvio e banho. No que se refere à apresentação dos fitoterápicos, eles estão dispostos na forma de essências, hidrolatos, tinturas.

As plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção de doenças (MARSH; MARTIN, 1992). Existe uma tendência para o aumento do uso destas plantas e isto seria de grande utilidade principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil, que apresenta uma grande biodiversidade e onde a população carente poderia ter acesso a formas terapêuticas de custos mais baixos em relação a medicamentos industrializados (MARCOTE; LAVOIE, 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Dentre as inúmeras plantas de interesse, destacam-se as do gênero *Mikania* (Família Compositae, tribo Eupatoriae), que são conhecidas como "guaco" ou "guaco cheiroso", e utilizadas pela medicina popular como expectorante, broncodilatador, antimicrobiana, antiasmática, cicatrizante e anti-reumática (PIO-CORRÊA, 1942). Distribuem-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai). No Brasil, ocorre principalmente nas regiões sul e sudeste. Desenvolvem-se como trepadeira arbustiva, lenhosa, apresentando caule cilíndrico e ramoso. O gênero *Mikania* possui cerca de 400 espécies, sendo que aproximadamente 10% destas foram estudadas quimicamente especialmente as

espécies *M. laevigata* e *M. glomerata*. Pesquisas já demonstraram que o extrato bruto da *M. laevigata* apresenta atividade antimicrobiana e é capaz de inibir *in vitro* a aderência celular de *S. sobrinus*, sugerindo que a mesma tem potencial anticariogênico (GIBBONS; VAN ROUTE, 1975; HAMADA; SLADE, 1980; YATSUDA et al., 2005).

Como uma grande preocupação da classe odontológica na atualidade é com a prevenção de doenças infecciosas na cavidade bucal, faz-se necessário o desenvolvimento de programas de prevenção e para isso é imprescindível o conhecimento da freqüência destas enfermidades e as características da população que se vai pesquisar (SANTOS et al., 2002).

Dentre estas afecções a candidíase ocupa lugar de destaque na odontologia, uma vez que cabe ao cirurgião dentista prevenir, tratar e identificar nos seus pacientes, a presença de condições predisponentes à implantação, multiplicação e desenvolvimento de infecção pelo gênero *Candida* e talvez o fator mais freqüentemente relacionado ao aumento da prevalência na candidíase seja o uso de próteses, especialmente totais, mal adaptadas e mal higienizadas (BERDISCEVSKI et al., 1980; MARSH et al., 1992; OHMAN et al., 1995; WEBB et al., 1998).

Finalmente, optou-se por testar novos fitoterápicos com ação antimicrobiana na cavidade bucal, dando ênfase a novos agentes antimicrobianos que atuem sobre os fatores de virulência ou mecanismos de patogenicidade dos microrganismos, sem a necessidade de serem bactericidas ou fungicidas.

2 Projeto de Pesquisa – **Atividade antimicrobiana e antineoplásica de alguns produtos naturais**

Introdução

A cavidade bucal, de modo similar a outros sítios do corpo humano apresenta uma microbiota natural com composição característica que na maioria das vezes coexiste de modo harmônico com o hospedeiro. Entretanto, a maioria dos indivíduos sofre, em algum período de sua vida, episódios localizados de doença bucais causados por um desequilíbrio na composição da microbiota bucal residente (MARSH, 1992). As manifestações clínicas deste desequilíbrio, que inclui a cárie dental, são endêmicas em sociedades industrializadas e estão aumentando em países em desenvolvimento (MARSH, 1992).

Atualmente está bem estabelecido que a cárie dental é uma doença infecciosa associada a um grupo de microrganismos. Estes microrganismos formam um biofilme patogênico que se adere sobre a superfície dental, de modo a produzirem ácidos e produtos citotóxicos que levam, respectivamente, a desmineralização do esmalte dental (MOSADOMI, 1987). Este biofilme é genericamente conhecido como placa dental. A placa dental que se forma sobre a superfície do dente apresenta uma composição microbiana e bioquímica variável, podendo mudar de modo a tornar este biofilme patogênico (MOSADOMI, 1987; OSAWA et al., 1992). Assim, fatores que levam ao desequilíbrio da comunidade microbiana de modo a favorecer o crescimento de bactérias odontopatogênicas, vão direcionar para o surgimento de uma placa dental relacionada à cárie dental (OSAWA et al., 1992).

Um dos fatores de desequilíbrio fundamental para o aparecimento de uma placa dental cariogênica é a dieta rica e freqüente em carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo mutans, como *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, uma vez que estes microrganismos apresentam vantagens ecológicas quando da presença de sacarose no meio bucal (NAPIMOGA et al., 2005).

Os estreptococos do grupo *mutans*, além de serem acidogênicos e acidúricos, não só fermentam a sacarose como a partir desta sintetizam polissacarídeos extracelulares (IKENO; IKENO; MIYASAWA, 1991; ISRAELSON, 1991). Esta síntese

é feita por enzimas chamadas genericamente de glucosiltransferases que facilitam a aderência dos estreptococos do grupo mutans, permitindo assim o seu acúmulo sobre a superfície lisa do esmalte dental. Inicia-se, assim, a formação da placa dental relacionada à cárie (NAPIMOGA et al., 2005).

Deste modo, o uso de agentes antimicrobianos eficientes contra estes patógenos bucais pode ser importante na prevenção da cárie dental (OSAWA et al., 2002; WU-YAN; CHEN; WU, 1988; YATSUDA et al., 2005).

Na década de 30 do século XX, eram raras as doenças associadas às espécies de *Candida*, e a candidíase sistêmica era praticamente desconhecida. Na atualidade, a candidíase superficial está entre as infecções mais comuns da pele e mucosas, e tanto a candidíase superficial como profunda são problemas de Saúde Pública. Isto se deve ao aumento de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), de hospedeiros imunodeprimidos de modo geral, devido ao tratamento prolongado com antibacterianos contribuindo assim para o desequilíbrio da microbiota. Desta forma, o indivíduo passa do estado de portador à doente (PAULA, 1998). É mais comum em crianças e tem como principal agente etiológico a *C. albicans*. Ela se manifesta quando há uma baixa na imunidade do paciente e se manifesta por placas brancas, podendo aparecer na língua, no palato e na bochechas, com aspecto semelhante ao de leite coalhado; estas são facilmente removíveis. Se não forem tratados adequadamente podem se espalhar pela boca e garganta, indo para esôfago e chegando até o estômago e pulmões. A mucosa abaixo das lesões apresenta-se avermelhada.

As drogas antineoplásicas atualmente disponíveis são incapazes de distinguir as células malignas das células normais em divisão e, por conseguinte, são potencialmente lesivas para ambas (YAGIELA; DOWD; NEIDLE, 2005).

Nas últimas décadas têm sido observado mundialmente, um crescente uso de produtos naturais para a prevenção de doenças bucais devido as suas possíveis propriedades farmacológicas, principalmente antimicrobianas (CAI; WU, 1996; LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1977; MARCOTE; LAVOIE, 1998; PEREIRA et al., 1994; PHILLIPS, 1991; WU-YUAN; GREEN; BIRCH, 1990). Assim, a descoberta de novos produtos naturais com atividade antibacteriana antineoplásica e talvez com menor efeito adverso, seria muito importante para obtenção de um meio efetivo de controle da formação da placa dental patogênica. Porém, para avaliar a efetividade da atividade biológica são necessárias análises progressivas começando com estudos

laboratoriais *in vitro*, passando por modelos de estudo *in vivo* e culminando com os estudos clínicos longitudinais (WU-YUAN; CHEN; WU, 1988).

A *fitoterapia* consiste na prática do uso de plantas ou de suas partes com finalidade terapêutica (MACIEL et al., 2002).

Quem iniciou o uso de fitoterápicos foram os chineses no ano 3000 a.C. Hoje, a Alemanha é um dos principais países precursores do uso de fitoterápicos (70% dos profissionais prescrevem fitoterápicos nos serviços de saúde) (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Políticas públicas para implantação de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) já foram discutidas e, muito em breve, favorecerão o processo de municipalização da Saúde visto que, apesar da evolução da Medicina alopática a partir da metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalar até a obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A *etnofarmacologia* é a ciência que estuda todos os produtos de origem animal ou vegetal de uso popular. *Fitofármacos* são medicamentos à base de plantas que contêm o princípio ativo isolado, ou seja, que contêm uma substância medicamentosa isolada a partir de extratos de plantas. Logo, *fitoterápico* consiste no uso de toda a planta, enquanto que *fitofármaco* refere-se apenas ao princípio ativo da planta (BRASIL, 2004; MACIEL et al., 2002).

Os estudos etnofarmacológicos no Brasil buscam fundamento nas tribos indígenas (Ex.: Waimiri, Atoari, Caiapós, Buritis, Yanomami), nos caboclos, populações da Amazônia e comunidades da zona rural (MACIEL et al., 2002).

O programa de investigação dos produtos naturais baseia-se fundamentalmente no conhecimento popular, a partir de entrevistas com “velhos”, “curandeiros”, “ervateiros”. Também são utilizados questionários para obter informações relacionadas ao número de plantas, coleta, período, partes da planta utilizada, nome popular, formas de utilização, coleta da amostra com o usuário, identificação taxonômica e processamento dos dados (MACIEL et al., 2002).

Quanto ao produto natural, é necessário obter-se informações da Medicina popular a respeito da sua toxicidade; realizar pesquisa bibliográfica; extrair

informações botânicas, taxonômicas e químicas; analisar fatores ambientais (local da coleta, época, etc.); verificar se é ativo farmacologicamente; realizar estudo etnofarmacológico; e identificar quando este composto é utilizado. Quando o produto natural é selecionado, são realizados ensaios farmacológicos e toxicológicos para confirmar sua atividade. Após, verifica-se se a substância ativa é conhecida, se existe faixa de concentração/dose para uso e a sua toxicidade (BOMBARDELLI; BOMBARDELLI, 2005; BRASIL, 2004; MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Um produto natural pode ser um organismo inteiro (planta ou animal) ou parte de um organismo (flores, folhas, raízes, glândulas).

A procura de novas substâncias torna-se necessária à medida que $\frac{2}{3}$ das doenças esperam tratamentos satisfatórios e surgem cepas resistentes.

Existem várias formas de preparo de fitoterápicos, dentre as quais merecem destaque: infusão, decocção, maceração, xarope, compressa, cataplasma, pedilúvio e banho. No que se refere à apresentação dos fitoterápicos, eles estão dispostos na forma de essências, hidrolatos, tinturas.

As plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção de doenças (MARSH; MARTIN, 1992). Existe uma tendência para o aumento do uso destas plantas e isto seria de grande utilidade principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil, que apresenta uma grande biodiversidade e onde a população carente poderia ter acesso a formas terapêuticas de custos mais baixos em relação a medicamentos industrializados (MARCOTE; LAVOIE, 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Dentre as inúmeras plantas de interesse, destacam-se as do gênero *Mikania* (Família Compositae, tribo Eupatoriae), que são conhecidas como "guaco" ou "guaco cheiroso", e utilizadas pela medicina popular como expectorante, broncodilatador, antimicrobiana, antiasmática, cicatrizante e anti-reumática (PIO-CORRÊA, 1942). Distribuem-se pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai). No Brasil, ocorre principalmente nas regiões sul e sudeste. Desenvolvem-se como trepadeira arbustiva, lenhosa, apresentando caule cilíndrico e ramoso. O gênero *Mikania* possui cerca de 400 espécies, sendo que aproximadamente 10% destas foram estudadas quimicamente especialmente as espécies *M. laevigata* e *M. glomerata*. Pesquisas já demonstraram que o extrato

bruto da *M. laevigata* apresenta atividade antimicrobiana e é capaz de inibir *in vitro* a aderência celular de *S. sobrinus*, sugerindo que a mesma tem potencial anticariogênico (GIBBONS; VAN ROUTE, 1975; HAMADA; SLADE, 1980; YATSUDA et al., 2005).

Mentha arvensis L., pertencente à família Lamiaceae, é conhecida popularmente pela sua atividade antimicrobiana, antifúngica, antivirótica e antitumoral (DUARTE et al., 2005; KUMAR et al., 2004; SCHUHMACHER; REICHLING; SCHNITZLER, 2003).

A planta *Jodina rhombifolia* Hook. et. Arn. (“cancorosa de 3 pontas”), pertencente à família Santalaceae e originária de SC e RS, é empregada em resfriados (ramos e folhas), disenterias (decoção das cascas), úlcera, problemas estomacais e carcinomas (decoção das folhas). Será realizado um *screening* ao acaso, baseado nas informações populares das propriedades das terapêuticas desta planta e baseado no estudo de Beira et al. (2000), para avaliar a atividade citotóxica sobre linhagem celular de carcinoma de cabeça e pescoço (HN30) e não tumoral de fibroblastos 3T3.

Carapa guianensis Aubl., popularmente conhecida no Brasil por “andiroba”, “andirova”, “angirova”, “carapa”, “carapinha”, apresenta uma larga aplicação na medicina popular e um grande potencial farmacêutico. Encontrada na região Amazônica, esta planta apresenta atividade antiinflamatória, diurética, anti-reumática, efetiva nas disfunções cutâneas e musculares, inseticida, antibacteriana, analgésica, antitumoral, dentre outras. Será avaliada a atividade antitumoral dos extratos de etérico e metanólico obtidos a partir do óleo das sementes da planta e fornecido pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da UFPel

A avaliação da atividade de extratos e frações de cogumelos também poderá levar à identificação e isolamento de novas substâncias com potencial aplicação na terapêutica humana contra o câncer. Os principais centros produtores de cogumelos localizam-se nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo os principais cogumelos cultivados: *Agaricus bisporus* (“Champignon”), *Lentinula edodes* (“Shiitake”), *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* (“Hiratake” e “Shimeji”) e, mais recentemente, *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann (popularmente denominado “Cogumelo-do-Sol” no Brasil e “Himematsutake” no Japão).

As pesquisas sobre as propriedades medicinais do *A. brasiliensis* iniciaram-se no Japão, mas hoje são realizadas também em outros países. Entre os pesquisadores brasileiros, Denadai et al. (2001) observaram o efeito do extrato de *A. blazei* (sinonímia de *A. brasiliensis*) como antimutagênico em camundongos e Menoli et al. (2001) relataram que o extrato de *A. blazei* exibe atividades antimutagênicas quando testado em células V79. A inibição de crescimento tumoral pelo extrato aquoso também foi observada por Takusaburo e Yoshiaki (1998) e Fan et al. (2003), e substâncias antitumorais (como os seus próprios polissacarídeos extracelulares) têm sido isoladas desses extratos (KAWAGISHI et al., 1990). No futuro, também poderá ser utilizado como uma dieta complementar, com efeito anticarcinogênico, conforme foi observado por Barbizan et al. (2002). Além disso, uma avaliação de 90 dias da toxicidade subcrônica do extrato aquoso de *A. blazei* Murrill, nas concentrações de 0 a 5%, em modelo animal com ratos, revelou que este extrato não ocasionou efeitos adversos significantes nos espécimes (KUROIWA et al., 2005).

Lentinula edodes tem demonstrado ser um dos únicos cogumelos comestíveis com potencial antimicrobiano de inibir o crescimento “*in vitro*” de bactérias, como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium*, assim como da levedura patogênica *C. albicans* (PACCOLA et al. 2001; HATVANI, 2001; HIRASAWA et al, 1999). Em adição a isto, um estudo testando a ação do extrato etanólico sobre células cancerosas de pele (CH 72) demonstrou uma redução da proliferação celular e induziu apoptose sem interferir nas células não-tumorais (C50) (GU; BELURY, 2005).

Estes resultados representam um possível avanço científico e econômico para o Brasil, o qual possui uma riqueza inestimável representada pela biodiversidade. O incentivo à pesquisa de novos fármacos a partir de plantas medicinais encontradas em nosso território, por pesquisadores brasileiros qualificados, em instituições nacionais, garante a consolidação de grupos de pesquisa que possam projetar o Brasil na concorrida área da indústria química-farmacêutica. Cabe reforçar que a descoberta de novos fármacos antitumorais permite ampliar as possibilidades de tratamento do câncer, melhorando a qualidade de vida da população atingida. Além disso, a geração de patentes, que advém de tais descobertas, representam não só um aumento de divisas para o Brasil, mas

garante a obtenção de fármacos com menor custo, os quais representam uma importante economia para o Sistema Único de Saúde (SUS).

Portanto considerando a grande biodiversidade do Brasil e o baixo custo desses produtos naturais, o objetivo deste projeto é avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos brutos da *Mikania laevigata*, *Mikania glomerata* e *Mentha arvensis*, sobre os patógenos bucais, bem como a atividade antitumoral dos extratos brutos e frações de *Carapa guianensis* Aubl. e *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes*.

Justificativa

O presente projeto propõe analisar a atividade antimicrobiana e antineoplásica de extratos brutos e fracionados das plantas *Mikania glomerata*, *Mikania hirsutissima*, *Mentha arvensis*, *Carapa guianensis* e *Jodina rhombifolia* e dos cogumelos *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes*, devido à:

1. Carência de informação do potencial antimicrobiano destes fitoterápicos sobre os patógenos bucais, principalmente com relação ao halo de inibição (teste de difusão em ágar), determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), e teste de aderência celular à superfície de vidro.

2. Falta de conhecimento a respeito da atividade antitumoral desses fitoterápicos.

Objetivos

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e fracionados de *Mikania laevigata*, *Mikania glomerata* e *Mentha arvensis*, caracterizadas quimicamente, as quais serão analisadas sobre os patógenos bucais envolvidos na cárie dental por meio através da:

1. Determinação de halo de inibição através do método de difusão em disco;
2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por macro e microdiluição em caldo;
3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM);
4. Determinação da aderência celular bacteriana à superfície de vidro

- Determinar *in vitro* a atividade antitumoral desses fitoterápicos em culturas de célula neoplásica (HN30) e fibroblástica (3T3) da cavidade oral.

Hipóteses

1) Os extratos etanólicos de *Mikania hissutissima* e *Mikania glomerata* apresentarão atividade antibacteriana sob os microrganismos cariogênicos, revelando uma ação bactericida e bacteriostática, além de atuarem positivamente contra um dos fatores de virulência dos estreptococos orais que consiste na aderência ao substrato dental.

2) *Mentha arvensis*, popularmente conhecida como “vique”, revelará ação fungistática contra diferentes linhagens de *Candida albicans*;

3) As plantas medicinais *Carapa guianensis* (“andiroba”) e *Jodina rhombifolia* (“cancorosa de 3 pontas”), assim como os cogumelos *Agaricus brasiliensis* s. Wasser (“cogumelo-do-sol) e *Lentinula edodes* (“shiitake”) deverão apresentar atividade antiproliferativa e citotóxica contra a linhagem de células tumorais de carcinoma de cabeça e pescoço (HN30), mas não se deverá observar morte celular na linhagem de células fibroblásticas (3T3).

Metodologia

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Matérias-primas

Partes (raízes, folhas e flores) das plantas *Mikania* serão coletadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CBPQA) da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil). Testemunhas dos espécimes de *Mikania glomerata* e *Mikania hirsutissima* serão depositadas no herbário do Instituto de biologia da UNICAMP de Campinas sob os números de registro (códigos) MG-4 e MG-37, respectivamente. As folhas serão secas em estufa sob circulação de ar (40°C) por três dias e moídas para obtenção dos extratos.

Folhas de *Mentha arvensis* e *Jodina rhombifolia* (“cancorosa de 3 pontas”) e sementes de *Carapa guianensis* (“andiroba”) serão coletados no município de Pelotas/RS e a exsiccata e registro das plantas será realizada por uma botânica da

UFPEl e depositadas no Herbário da mesma instituição. As folhas serão secas, primeiramente a temperatura ambiente e, depois, sob circulação da ar (40 °C) por três dias e moídas a obtenção do extrato. Depois disso, será dado prosseguimento aos processos de extração.

Os corpos frutíferos dos cogumelos *A. blazei* e *L. edodes* serão obtidos através do Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Obtenção dos extratos e frações

Extratos etanólicos de Mikania - O pó resultante da trituração das folhas secas de *M. glomerata* e *M. hirsutissima* serão submetido à maceração dinâmica com 2L de solução de etanol : água (70:30, v/v) por 3h. Os extratos serão filtrados e este procedimento será repetido por duas vezes com uma solução de etanol: água (70:30), sob agitação mecânica. Após filtração, o processo acima será repetido e os extratos serão concentrados em evaporador rotativo até eliminação de todo etanol e em seguida serão liofilizados, fornecendo os extratos MG-4 e MG-37.

Extrato hidroalcolico de Mentha arvensis L. - Será realizado um extrato hidroalcolico de *Mentha arvensis L.* na concentração de 15,9%. Para isto, o pó vegetal resultante será submetido à maceração dinâmica com solução etanol:água (70:30, v/v) por 3h. Serão utilizadas 25,5g de folhas secas de “hortelã-pimenta” secas e moídas, para 160mL de etanol 70%. O extrato será então filtrado e este procedimento será repetido mais duas vezes. Logo, a extração hidroalcolica terá uma duração total de 9h. Depois disso, o extrato será concentrado sob pressão reduzida e temperatura de 41°C, em evaporador rotativo, com velocidade de 15 a 20 rotações/minuto, até eliminação de todo etanol. De acordo com um estudo-piloto prévio, realizado pela mesma equipe de pesquisadores, o rendimento de extrato que irá se obter com 25,5g de folha seca moída para 160mL de etanol 70% será de 76mL. Em seguida será liofilizado, fornecendo assim um pó do extrato hidroalcolico bruto o que garantirá a preservação da amostra até a sua utilização no teste antifúngico.

Extratos metanólico e aquoso de Jodina rhombifolia (folha) – O extrato aquoso será preparado por decocção das folhas em água destilada, na temperatura de 70°C. Serão utilizados 25g de biomassa vegetal (pó resultante das folhas secas e

moídas) para 300mL de água. A duração total da extração será de 9h. A cada 3h, o extrato será decantado e filtrado e mais 300mL de água será adicionado ao resíduo para continuar o processo de extração. Este procedimento será repetido 3x. Logo, será gasto um volume total de 900mL de água para as 30g de biomassa vegetal utilizada. Transcorrido o período de extração, os volumes de extrato serão reunidos, congelados a -20°C e, depois, -83°C , e submetidos à liofilização em aparelho liofilizador do Departamento de Biotecnologia da UFPel. O extrato metanólico será obtido por maceração dinâmica de 30g da biomassa da planta com 900mL de metanol absoluto, à temperatura de 40°C e durante o período de 72h. O extrato metanólico também será submetido à partição líquido-líquido (3x, à temperatura de 25°C) com adição de metanol (fração metanólica) ou hexano (fração hexânica). Todos serão secos em evaporador rotatório.

Óleo de *Carapa guianensis* (semente) - Os extratos obtidos dos óleos das sementes desta planta serão preparados segundo Ollis (1970) e fornecidos pelo Laboratório de Oleoquímica do Departamento de Química Orgânica da UFPel.

As sementes serão moídas no liquidificador e submetidas à extração por maceração, por 2 dias, em éter de petróleo. Depois disso, será realizada filtração a vácuo do extrato e este será concentrado por destilação simples, obtendo-se assim o óleo. Após esta etapa de maceração, o resíduo será submetido à extração em Soxhlet com éter de petróleo, para remover as gorduras residuais. Para isso, cerca de 120g de andiroba serão submetidos a extrações sucessivas de 4h (5x) e os extratos concentrados, usando destilação simples. Desta forma, será obtido o extrato de éter de petróleo (CGEP).

Algumas amostras retiradas dos extratores de Soxhlet serão secas, pesadas e submetidas à extração com solvente metanol sob refluxo por 4h (5x). O solvente será concentrado no evaporador rotatório à temperatura ambiente. Por decantação, será obtido um precipitado que será recuperado sob filtração a vácuo e, após seco, resultando no extrato metanólico (CGEM).

Extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes* do basidioma – Para a extração aquosa do corpo frutífero do cogumelo serão utilizados 100g de pó seco de cada cogumelo, obtidos da trituração do corpo frutífero destas espécies. O extrato aquoso será preparado por decocção do pó em água destilada, a 70°C . Serão utilizados 30g de biomassa vegetal (pó resultante das folhas secas e moídas) para 300mL de água. A duração total da extração será de 9h. A cada 3h, o extrato

será decantado e filtrado e mais 300mL de água será adicionado ao resíduo para continuar o processo de extração. Este procedimento será repetido 3x. Logo, será gasto um volume total de 900mL de água para as 30g de pó utilizado. Transcorrido o período de extração, os volumes de extrato serão reunidos, congelados a -20°C e, depois, -83°C , e submetidos à liofilização em liofilizador.

MICROORGANISMOS

Os microrganismos utilizados serão estreptococcus do grupo mutans:

- *Streptococcus mutans UA159*
- *Streptococcus sobrinus 6715*

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Os microrganismos serão inicialmente reativados a partir das suas culturas originais mantidas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) contendo 20% de glicerol à -80°C (ou liofilizadas) e posteriormente serão cultivados em placas de ágar BHI e Ágar Columbia contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro nas seguintes condições: temperatura de 37°C , em atmosfera de 10% CO_2 por 18-24 horas. Colônias isoladas serão ressuspensas em 5mL de solução de NaCl 0.89% estéril até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de Mc.Farland ($1,5 \times 10^8$ bact/mL). A suspensão assim obtida será utilizada para as determinações descritas a seguir.

HALO DE INIBIÇÃO

Os procedimentos para a determinação dos halos de inibição serão realizados de acordo com a metodologia descrita por Piddock (1990). Uma alíquota de 400 μL de cada suspensão bacteriana será homogeneizada com 40 mL de ágar BHI a 45°C , sendo distribuída em placa de Petri (\varnothing 150mm), sobre uma camada

base preexistentes de ágar MH (Mueller Hinton). Para o método de difusão em ágar, os procedimentos do inóculo são apropriados para providenciar um crescimento semi-confluyente dos microrganismos testados ($1-2 \times 10^8$ UFCs/mL).

Seis cilindros estéreis de aço-inoxidável 8.0 x 10 mm (diâmetro interno de 6 mm) serão colocados sobre cada placa de ágar inoculado. Os extratos secos de *Mikania hirsutissima* e *Mikania glomerata* serão diluídos em etanol absoluto (100%, v/v) até obter uma concentração de 10%. 40µL dos extratos e o seu controle negativo (100%, v/v) serão colocados nos cilindros. As placas serão mantidas por 2 h na temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos através do ágar. Após estes procedimentos, as placas serão incubadas em ambiente de microaerofilia, em temperatura de 37°C e 10% de CO₂.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação do CIM será realizado em meio líquido, através da técnica de macro-diluição (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990). Para isto, a suspensão microbiana será homogeneizada em caldo BHI na proporção 1:1000 (v/v) (diluído em relação ao inóculo utilizado para halo de inibição) de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL, e a concentração dos extratos testados variará de 25 a 1600 µg/mL.

Após a homogeneização, 4960µL serão transferidos em tubos de vidro estéreis, sendo posteriormente pipetados 40µl dos extratos de *Mikania glomerata* e *Mikania hirsutissima* (com concentração final variando entre 2,5 e 177,8µg/mL) ou controle negativo (etanol 100%, v/v). Os tubos serão em seguida homogeneizados com auxílio de um vortex em baixa velocidade e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente (temperatura de 37°C e 10% de CO₂).

O CIM será considerado a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura da absorbância a 600 nm (Abs.₆₆₀) menor que 0,05.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Os tubos incubados para determinação da CIM em meio líquido serão utilizados para determinação da CBM (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990). Uma alíquota (50µl) será inoculada em placas de Ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro e posteriormente as placas serão incubadas em ambiente a 37°C e 10% CO₂. O CBM será considerado a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

TESTE DE ADERÊNCIA CELULAR À SUPERFÍCIE DE VIDRO

Será preparado meio de cultura BHI caldo com 1% de sacarose. O inóculo será padronizado em nível de absorvância de 660nm (0,135 abs). A inoculação do meio será na proporção de 1:100. O meio inoculado será distribuído (2480µL) em tubos de vidro rosqueados e serão acrescentados 20µL das amostras de extratos. Serão separados dois tubos para controle negativo com etanol 100%. Após agitação, os tubos serão incubados por 18h, a 37°C e 10% de CO₂. Os tubos serão dispostos numa angulação de 30°.

A leitura poderá ser visível ou em espectrofotômetro.

Para leitura em espectrofotômetro, será pipetado 1mL de tampão fosfato de potássio 0.05M, pH 6.8, contendo 0.02% de azida sódica. Em seguida, as células bacterianas aderidas aos tubos serão gentilmente lavadas e o seu sobrenadante descartado. Este procedimento será repetido. Depois, serão pipetados 5mL de tampão e se realizará a seqüência: agitação em aparelho Vortex, Ultrassom, e desprendimento com auxílio com bastão de vidro. Com isto, será finalizado o procedimento para realização da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550nm (luz visível). Os resultados serão obtidos pelo cálculo da diferença entre o valor encontrado e o valor obtido pelo controle.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Serão realizadas triplicatas de 4 experimentos distintos para cada concentração dos extratos utilizada (n=9). Os dados obtidos serão submetidos inicialmente a uma análise exploratória para determinação do melhor teste

estatístico, sendo em seguida aplicado o teste mais conveniente para cada análise do presente trabalho.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação antifúngica do extrato hidroalcolico de *Mentha arvensis* L. será realizado através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC) de acordo com o documento de referência M27A2 (NCCLS/CLSI, 2005). Esta metodologia será utilizada para testar as leveduras frente ao extrato hidroalcolico das folhas de *Mentha arvensis* L., recebendo uma adaptação da técnica para este. O teste de susceptibilidade pelo método de MC será realizado em placas plásticas de microtitulação estéreis (Nuclon^{®1}) com 96 poços de fundo chato, constituídos em oito séries identificadas de A a H, cada qual com doze poços. A partir da solução-mãe do extrato vegetal 10% será realizada uma diluição seriada de razão 2 em caldo RPMI-1640. As dez diferentes concentrações obtidas a partir do extrato hidroalcolico bruto serão diluídas a 1:5 em meio de cultivo RPMI e alíquotas de 100µl dessas concentrações serão dispensadas seqüencialmente nas placas de microtitulação, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez.

Para leitura do teste, será realizada comparação visual e espectrofotométrica do crescimento da levedura ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poços de 1 a 10) com o seu crescimento no poço-controle positivo. A menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo sem o extrato vegetal testado será identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima) do extrato vegetal para esta amostra. Todas as diluições do extrato vegetal e grupos de controle serão testados em duplicata.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

LINHAGENS CELULARES

¹ Intermed, Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca

Serão utilizadas uma linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal, **HN30** (National Institutes of Health), e uma linhagem não-tumoral de células-controle, **3T3**, fibroblastos embrionários de ratos.

CULTIVO E LINHAGEM CELULAR

As células serão mantidas estocadas em nitrogênio líquido e após o descongelamento em banho-maria, serão distribuídas (5×10^5 ml/células) em garrafas para cultivo celular contendo 3 ml de meio de cultura DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilina/anfotericina B - Sigma). O meio de cultivo será trocado a cada dois ou três dias e o acompanhamento do crescimento celular se dará a cada 24 horas, através de um microscópio óptico invertido (Quimis[®], Diadema, SP, Brasil).

As células serão mantidas em estufa (marca da estufa) a 37°C, numa atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Os subcultivos serão realizados quando a densidade celular atingir mais de 80% de monocamada confluenta. Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo de células tumorais serão realizados em gabinete de biossegurança.

A contagem celular será obtida através do método da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan. Essas células serão ressuspensas em PBS e coradas com azul de Trypan a 0,4%, o qual penetra a membrana de células mortas corando-as. Ambas as câmaras de um hemocítômetro (câmara de Neubauer) receberão essa suspensão de células, as quais serão contadas sob microscópio invertido de fase. O número total de células e o número total de células viáveis serão obtidos através de equações matemáticas.

O percentual de viabilidade da população celular será obtido dividindo-se o número total de células viáveis pelo número total de células e o resultado multiplicado por 100 (FRESHNEY, 2005).

As linhagens celulares HN30 e 3T3 serão cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino e incubadas em ambiente à temperatura 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Após 24h de incubação, serão submetidas a diferentes concentrações dos extratos e frações. Transcorrido 48h, será realizado ensaio colorimétrico de quantificação de viabilidade celular com os corantes sulforodamina

B ou MTT e feita a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 492 nm e/ou 540nm.

REFERÊNCIAS

- BARBIZAN, L. F.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVADORRI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; CAMARGO, J. L. V. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 25-32, 2002.
- BEIRA, F. T. A. Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de la planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. , Universidad de Barcelona, Barcelona, 2000.
- BOMBARDELLI, E.; BOMBARDELLI, V. Twenty years' experience in the botanic health food market. **Fitoterapia**, v. 76, p. 495-507, 2005.
- BRASIL. Resolução RDC – nº 48, de 18 de março de 2004 (DOU 18/03/2004). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. ANVISA, Brasília, 2004.
- CAI, L. ; WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal Natural Products**, v. 59, p. 987-990, 1996.
- DENADAI, R.; LIMA, P. L. A.; SALVADORI, D. M. F.; EIRA, A. F.; BAZO, A. P.; RIBEIRO, L. R. The protective effect of mushroom (*Agaricus blazei*) teas on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 179, 1998.
- DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELENA, C. Anti-*candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005
- FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A. L.; SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* s. Wasser et al. LPB 03 (Agaricomycetideae) in submerged fermentation and its antitumor effect. **International Journal of Medicinal Mushroom**, v. 5, p. 17-23, 2003.
- GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, v. 29, p. 19-44, 1975.
- GU, Y.-H.; BELURY, M. A. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. **Cancer Letters**,

v. 220, p. 21-28, 2005.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 407-411, 1980.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium growth in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 71-74, 2001.

HIRASAWA, M.; SHOUJI, N.; NETA, T.; FUKUSHIMA, K.; TAKADA, K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, p. 151-157, 1999.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 25, p. 347-351, 1991.

ISRAELSON, L. The role of natural products in oral health care. **Journal of Clinical Dentistry**, (Spec. Iss), p. 5-6, 1991.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1→6) β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrate Research**, v. 12, p. 393-403, 1990.

KUMAR, A.; SAMARTH, R. M.; YASMEEN, S.; SHARMA, A.; SUGAHARA, T.; TERADO, T.; KIMURA, H. Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. **Biofactors**, v. 22, n. 1-4, p. 87-91, 2004.

KUROIWA, Y.; NISHIKAWA, A.; IMAZAWA, T.; KANKI, K.; KITAMURA, Y.; UMEMURA, T.; HIROSE, M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1047-1053, 2005.

LEWIS, H.; ELVIN-LEWIS, M. P. F. In.: *Medical Botany*. New York, Wiley & Sons, 1977.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCOTE, H. ; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 71-109, 1998.

- MARSH, P. D. & MARTIN, M. Oral microbiology, 3rd ed. Chaoman & Hall, Ltd, London, United Kingdom, 1992.
- MARSH, P.D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **Journal of Dental Research**, v. 71, p. 1431-1438, 1992.
- MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of of the mushroom *Agaricus blazei*_Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v. 496, p. 5-13, 2001.
- MOSADOMI, H.A. The effect of crude extracts of nine African chewing sticks on oral anaerobes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 23, p. 55-60, 1987.
- NAPIMOGA, M. H.; HOFLING, J. F.; KLEIN, M. I.; KAMIYA, R. U.; GONÇALVES, R. B. Transmission, diversity and virulence factors of Streptococcus mutans genotypes. **Journal of Oral Science**, v. 47, p. 59-64, 2005.
- NCCLS/CLSI. Método de Referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma aprovada – 2a edição. (ANVISA, ed.), Vol. 22, n. 15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasil, 2005.
- OSAWA, K. YASUDA H, MARUYAMA T, MORITA H, TAKEYA K, ITOKAWA H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 2970-2974, 1992.
- PACCOLA, E. A. S.; MAKI, C. S.; NOBREGA, G. M. A.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 176-178, 2001.
- PAULA, C. R. Candidíases. In.: Compendio de Micologia Médica (C. C. ZAITZ, I.; MARQUES, A. S., ed.), pp. 99-107. Medsi, Rio de Janeiro, 1998.
- PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; do NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antifotes, IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.
- PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 27, p. 1-50, 1991
- PIDDOCK, L. J. V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 307-318, 1990.

- PIO CORRÊA, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Vol. 3, pp. 517-520. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1942.
- SCHUHMACHER A, REICHLING J, SCHNITZLER P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 504-510, 2003.
- SUDBO, J.; REITH, A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. **International Journal of Cancer**, v. 115, p. 339-345, 2005.
- TAKUSABURO, E.; YOSHIKI, F. Antitumor effect of peptideglucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)**, v.11, p. 249–265, 1998.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- WU-YUAN, C.D.; CHEN, C.Y.; WU, R.T. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans streptococci. **Journal of Dental Research**, v. 67, p. 51-55, 1988.
- WU-YUAN, C.D.; GREEN, L.; BIRCH, W.X. *In vitro* screening of chinese medicinal toothpastes: Their effects on growth and plaque formation of mutans streptococci. **Caries Research**, v. 24, p. 198-202, 1990.
- YAGIELA, J. A.; DOWD, F. J.; NEIDLE, E. A. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry, 5th edition, Ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri.
- YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L. G.; Effect of *Mikania* genus plant on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 183-189, 2005.

Cronograma

Atividade/Ano e trimestre	2004				2005				2006				2007				2008	
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	
Revisão de literatura	X	X																
Obtenção dos extratos etanólicos de <i>Mikania hirsutissima</i> e <i>Mikania glomerata</i> através do CPQBA, SP, Brasil			X															
Diluição e esterilização dos extratos			X															
Projeto piloto			X															
Colheita da <i>Mentha arvensis</i> L.				X														
Secagem				X														
Exsicata					X													
Determinação do Halo de inibição					X													
Determinação da CIM						X												
Determinação da CBM						X												
Teste antimicrobiano de aderência celular à superfície de vidro							X	X										
Pulverização das folhas secas de <i>M. arvensis</i> L.								X	X									
Extração etanólica e liofilização de <i>M. arvensis</i> L.								X	X									
Preparo de solução-teste do liofilizado de <i>M. arvensis</i>										X								
Isolamento clínico das leveduras de <i>Candida</i> e armazenamento											X	X	X	X				
Teste antifúngico com <i>M. arvensis</i> L.															X	X		
Obtenção do óleo de <i>Carapa guianensis</i> e preparo dos extratos e frações de <i>Jodina rhombifolia</i>											X	X						

Orçamento

Natureza	Quantidade	Preço (R\$)
<i>Reagentes químicos</i>		
Etanol PA	2L	35,00
Acetato de etila	2L	180,00
Clorofórmio	2L	170,00
Hexano	2L	190,00
Éter de petróleo	2L	300,00
Metanol PA	4L	250,00
Tampão MOPs		380,00
Sacarose PA	250g	70,00
Hipoclorito de sódio 10%	60kg	63,00
<i>Meios de Cultura</i>		
Agar BHI	500g	178,00
Caldo BHI	500g	156,00
Agar Mueller-Hinton	500g	156,00
Agar Columbia	500g	330,00
RPMI 1640	1L	80,00
Saborraud Dextrose Agar	500g	300,00
DMEM	5L	750,00
<i>Matérias-primas</i>		
Cogumelo-do-sol	5kg	75,00
Shiitake	5kg	75,00
<i>Material permanente de laboratório</i>		1.000,00
<i>Produção de painéis</i>		200,00
<i>Publicações</i>		200,00
<i>Digitação e impressão dos artigos</i>		500,00
<i>Materiais diversos</i>		100,00
TOTAL		5.482,00

3 Revisão de Literatura

3.1 Candidíase

Os tratamentos prolongados com antibacterianos, assim como os avanços tecnológicos na medicina e o aumento de hospedeiros imunodeprimidos têm contribuído para o desequilíbrio da microbiota oral. Diante desta realidade, *Candida albicans* tornou-se o microrganismo responsável por infecções de pele e mucosas, sendo considerado um problema de Saúde Pública (PAULA, 1998; CALDERONE; FONZI, 2001).

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos integrantes da microbiota humana desde o nascimento. Esta condição propicia comumente uma relação de equilíbrio entre parasita-hospedeiro diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais. Um desequilíbrio deste binômio pode levar à uma micose superficial denominada candidíase (BURNETT et al., 1998; JORGE, 1998; LACAZ et al., 2002).

A compatibilidade de coexistência dessa população microbiana com a saúde individual decorre do desenvolvimento, desde o início da vida humana, através de mecanismos imunológicos, de um processo de adaptação e readaptação contínuo. Esta condição microbiológica propicia comumente uma relação de equilíbrio entre microrganismo-hospedeiro, diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte da levedura, permanência equilibrada da capacidade de aderência às superfícies da cavidade oral e da produção de enzimas e toxinas. Devido a isso, se estabelece um vínculo biológico entre o organismo humano e os microrganismos que ele costuma abrigar. Tal vínculo garante a condição sapróbia desses microrganismos, em equilíbrio ecológico denominado anfibiose, caracterizando uma situação entre simbiose e a antibiose (LACAZ et al., 2002).

Uma variedade de mecanismos de proteção age intraoralmente. O epitélio atua como uma barreira física, e a renovação epitelial contribui para a defesa do hospedeiro. Além disso, a mucosa oral é constantemente lubrificada pela saliva, que possui função diluente, enxaguatória e contém fatores antimicrobianos, incluindo lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase, que constituem uma barreira de proteção

contra microrganismos onde são incluídos vários fungos, entre eles as leveduras do gênero *Candida*. O sistema imune secretor é um sistema imunológico local que protege a mucosa e que pode ser estimulado independentemente da imunidade sistêmica (CHALLACOMBE, 1994).

O equilíbrio da microbiota oral pode ser alterado, facilitando o desenvolvimento de ação patogênica, por parte dos microrganismos que a integram, destacando-se a *Candida albicans* em porcentagens que variam entre 30 a 60% e em menor número as espécies *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* entre outras (BURNETT et al., 1978). Desta forma, esta levedura deixa a sua condição sapróbia e passa, ocasionalmente, a exercer a ação patogênica quando a virulência do fungo supera a resistência do hospedeiro (CHIMENOS et al., 1998).

A aderência de *Candida* é considerada um importante fator de virulência visto que consiste no primeiro estágio da colonização da levedura em várias regiões do hospedeiro, sendo a causa inicial da infecção (PIRES et al., 2001)

A candidíase pode ser definida como uma infecção micótica causada pelo fungo do gênero *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente, porém outras espécies têm sido citadas, como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, *C. krusei*, *C. kefir* e *C. dubliniensis*, associadas à recorrência de candidíase oral em imunodeprimidos (COLEMAN et al., 1998; SULLIVAN et al., 1995; PAULA, 1998).

Calcula-se que aproximadamente em 60% ou mais dos indivíduos sadios se podem isolar *Candida*. Todavia não está claro por que algumas pessoas podem ser portadoras e outras não, porém fatores nutricionais e interações com a microbiota bacteriana podem ser importantes (ALDRED et al., 1989; CHIMENOS et al., 1998).

Vários fatores são citados como responsáveis pela ocorrência das candidíases, os mais conhecidos em relação ao hospedeiro são: fase de crescimento do hospedeiro, perda de dentes, restaurações, aparelhos (ortodônticos e protéticos), mudanças de hábitos alimentares, higiene oral, doenças sistêmicas, alterações hormonais, certas drogas sistêmicas e locais, imunodepressão, radiação e quimioterapia (ALDRED et al., 1989; BARTHOLOMEW et al., 1987). Dentre os fatores de virulência do agente fúngico, refere-se ao fenômeno de aderência (adesina), à forma miceliana, à variabilidade fenotípica, à produção de enzimas

extracelulares (protease e fosfolipase) e às toxinas produzidas (PAULA, 1998; BURNETT et al., 1978).

Pacientes infantis portadores de distúrbios hematológicos, como leucemia, são hospedeiros facilmente susceptíveis a infecções microbianas, especialmente por fungos do gênero *Candida* (WANG et al., 2005). A candidemia em crianças e adultos tem crescido nos últimos anos e, muitas vezes, é proveniente da estadia dos pacientes em ambientes hospitalares, e pode também levar à morte dos indivíduos (ZAOUTIS et al., 2005).

Pacientes imunodeprimidos, portadores de HIV, apresentam predominantemente infecção por leveduras do gênero *Candida*, instalada principalmente na língua ou mucosa oral. A má nutrição também consiste num fator predisponente da ocorrência da micose, no entanto, a infecção por HIV é o fator de risco com maior relevância (SCHEUTZ et al., 1997).

Um estudo comparativo da presença de leveduras de *Candida* em crianças portadoras ou não de Síndrome de Down revelou uma diferença estatisticamente significativa naquelas acometidas por essa alteração cromossômica, sendo estas mais vulneráveis à candidíase bucal, talvez devido às alterações anátomo-fisiológicas da cavidade oral decorrentes da trissomia do cromossomo 21 (VIEIRA et al., 2005).

C. albicans consiste na levedura predominante em infecções orais, principalmente em crianças e pouco se sabe da sua homeostasia em ambiente oral. O recém-nascido, por si só, já é um ser imunodeprimido, por não possuir ainda as suas defesas orgânicas constituídas, sendo um alvo fácil para a proliferação de uma infecção fúngica. O contágio em recém nascido se dá durante a passagem pelo canal de parto e posteriormente em contato com pessoas e objetos contaminados (bicos de mamadeiras e chupetas) raramente se dá intra-útero.

Numa pesquisa realizada com 150 crianças portuguesas, após 36 meses de avaliação pós-tratamento dos escolares, foi observado que crianças portadoras de candidíase oral continuavam a manter um foco de infecção mesmo após o tratamento e apresentando boas condições de higiene oral (STARR et al., 2002).

Uma investigação da virulência e propriedades adesivas de 50 isolados de *C. albicans*, sorotipos A e B, coletados em 40 pacientes pediátricos infectados, não demonstrou relação entre a virulência e a adesividade com o biotipo, sorotipo ou sítio de isolamento da espécie coletada (KENNEDY ET AL., 1992). Por outro lado,

uma pesquisa de Tortorano et al. (TORTORANO et al., 2005) revelou forte correlação entre a formação de biofilme de *Candida* com as leveduras desta espécie de sorotipo B.

A identificação correta e precisa do agente causal é importante para a caracterização epidemiológica das infecções, como também para a escolha do tratamento. Desta maneira a identificação das espécies de *Candida* é de extrema utilidade nos laboratórios de rotina. O arsenal terapêutico antifúngico tem aumentado muito nos últimos anos, buscando atender a uma demanda crescente na micologia médica, destacando o tratamento tópico de dermatomicoses (NIMURA et al., 2001). Na década de 80, alguns fatos como incremento de diagnóstico, aumento das septicemias por leveduras, uso de procedimentos terapêuticos e/ou cirúrgicos invasivos ou até mesmo o surgimento de novas doenças imunossupressoras como a AIDS têm pressionado a indústria químico-farmacêutica no sentido de buscar novas alternativas de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas (LACAZ et al., 2002; SIDRIN; ROCHA, 2004).

A terapêutica de doenças fúngicas apresenta grande descompasso em relação à terapêutica antibacteriana, podendo essa assertiva ser facilmente comprovada pela disparidade numérica entre antifúngicos e antibacterianos disponíveis no mercado (SIDRIN; ROCHA, 2004). Algumas drogas antifúngicas, tais como os macrolídeos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os azóis (fluconazol, itraconazol e cetoconazol) são freqüentemente utilizados em terapias antifúngicas com certas limitações devido aos seus efeitos colaterais como toxicidade e surgimento de cepas resistentes (PFALLER, 2005; PFALLER; DIEKEMA, 2004; YAGIELA et al., 2004).

Na literatura existem relatos de leveduras resistentes a antifúngicos e um dos principais elementos responsáveis a isso foi a pandemia da AIDS, uma vez que os azóis representaram opção terapêutica menos tóxica e mais cômoda que a anfotericina B, pois freqüentemente os indivíduos acometidos por candidíase oral e esofágica faziam uso de fluconazol por tempo prolongado e conseqüentemente inúmeros relatos de resistência de *C. albicans* ao fluconazol em pacientes com AIDS foram descritos (PFALLER et al., 1994).

A candidíase oral apresenta quatro formas básicas de manifestação clínica, segundo classificação de Neville et al. (2002): (1) candidíase pseudomembranosa aguda, (2) candidíase atrófica aguda; (3) candidíase atrófica crônica, e (4) candidíase crônica hiperplásica.

Neste estudo, foi pesquisada a candidíase atrófica crônica, também conhecida como “estomatite por dentadura”, que é caracterizada por eritema crônico, comumente vista no palato sob base de dentadura e na comissura labial, em consequência da perda de dimensão vertical de oclusão (DVO), da idade avançada ou pela deficiência de complexo B, onde recebe a denominação de queilite angular por candidíase. Esta condição é caracterizada por vários graus de eritema, como lesões puntiformes, eritema difuso, máculas eritematosas, algumas vezes acompanhados de micropápulas (hiperplasia papilar) (AKPAN; MORGAN,2002; NEWTON, 1962)..

3.2 Cárie dental

A cárie dental é uma doença multifatorial infecto-contagiosa associada a bactérias patogênicas residentes no biofilme dental, dentre as quais merecem destaque os estreptococos do grupo mutans (NAPIMOGA et al., 2005; BABAAHMADY et al., 1998). Os estreptococos do grupo *mutans* são os principais agentes etiológicos da cárie dental em humanos e são classificados em sete espécies. Dessas espécies, *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* são os mais freqüentemente isolados da cavidade bucal humana. Adicionalmente, pesquisas têm demonstrado que a coexistência de *S. mutans* e *S. sobrinus* é um importante fator no desenvolvimento da cárie dental (BABAAHMADY et al., 1998).

O biofilme dental ou placa dental é uma estrutura que serve como defesa dos microrganismos residentes contra o hospedeiro e agente antimicrobianos. Por isso, o controle da placa dental é o fator chave na prevenção de cáries e doenças periodontais (BABAAHMADY et al., 1998).

A formação deste biofilme inicia-se com a formação da película adquirida que é uma fina camada aderida à superfície dental, constituída principalmente por componentes salivares, além de produtos bacterianos e constituintes citoplasmáticos (GIBBONS; VAN HOUTE, 1975). Minutos após sua formação, bactérias interagem com a película através de uma série de mecanismos específicos (GIBBONS, 1996; JENKINSON; LAMONT, 1997) e na seqüência, outras bactérias da mesma espécie e espécies diferentes se aderem tanto à película adquirida quanto às bactérias já aderidas (KOLENBRANDER, 1988).

A cavidade oral apresenta uma microbiota natural com composição característica que na maioria das vezes coexiste de modo harmônico e pacífico com

o hospedeiro, mantendo a integridade dos tecidos bucais. Entretanto, alguns fatores podem causar um desequilíbrio desta comunidade, de modo a favorecer o crescimento e o estabelecimento de bactérias odontopatogênicas, como os estreptococos do grupo *mutans*. Um dos principais fatores desse desequilíbrio é a dieta rica e freqüente em sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo *mutans*, uma vez que estes microrganismos apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença deste açúcar no meio bucal, permitindo a sua aderência, colonização e posterior acúmulo na superfície do esmalte dental (HAMADA; SLADE, 1980).

Uma forma de reduzir a formação de biofilme é a remoção mecânica em intervalos regulares com escovas de dente e fio dental. Entretanto, pacientes especiais, com dificuldades motoras ou impossibilitadas da prática de escovação não conseguem realizá-la. Assim, o controle químico se faz necessário nesses casos. Deste modo, estratégias têm sido estudadas no sentido de prevenir a cárie dental, seja inibindo o crescimento dos estreptococos do grupo *mutans* na cavidade bucal ou inibindo a aderência destas bactérias à superfície dos dentes, impedindo assim a formação do biofilme dental (BABAAHMADY et al., 1998).

Vários agentes químicos têm sido ensaiados com o objetivo de restringir o efeito nocivo do biofilme ao hospedeiro, tais como flúor, antibióticos e antissépticos, particularmente a clorexidina, que é muito eficaz na inibição do biofilme e tem diferentes usos como adjunto ou substituto temporário no controle mecânico do biofilme. Ela é um dos mais seguros e eficientes agentes antimicrobianos, porém, apresenta vários efeitos colaterais. As manchas dentais são o efeito adverso mais importante da clorexidina, embora o gosto desagradável, alterações no paladar, erosões mucosas também sejam outros efeitos adversos importantes e que motivam o desenvolvimento de outros agentes antimicrobianos (SARI; BIRINCI, 2007; ZANATTA et al., 2007).

3.3 Plantas medicinais

Atualmente tem sido observado um crescente uso de produtos naturais para a prevenção de doenças, devido às suas possíveis propriedades farmacológicas, principalmente antimicrobianas (ALIGIANIS et al., 2001; DUARTE et al., 2005; QUIROGA et al., 2001; XIAO et al., 2007; HAMMAD et al., 2007; FANI et al., 2007).

As plantas medicinais produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, muitos deles com atividade antibacteriana e antifúngica. Exemplos bem conhecidos destes compostos são os flavonóides, fenóis e glicosídeos fenólicos, lactonas insaturadas, compostos sulfurados, saponinas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (QUIROGA et al., 2001). Com base na literatura, a investigação de produtos naturais ativos contra estreptococos orais e *Candida* spp. cresceu significativamente nos últimos 10 anos, com a pesquisa de aproximadamente 258 espécies de plantas de 94 famílias (DUARTE et al., 2005).

Assim, a descoberta de novos produtos naturais com atividade antibacteriana e talvez com menor efeito adverso, quando comparados aos produtos industrializados, seria de grande importância para obtenção de um meio efetivo de controle da formação de um biofilme patogênico. Porém, para avaliar a atividade biológica, são necessárias análises progressivas começando com estudos laboratoriais *in vitro*, passando por modelos de estudo *in vivo* e culminando com os estudos clínicos longitudinais (TEN CATE E MASH, 1994).

As plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção (LEWIS E ELVIN-LEWIS, 1977). Existe uma tendência para o aumento do uso destas plantas e isto seria de grande utilidade principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil, que apresenta uma grande biodiversidade e onde a população carente poderia ter acesso a formas terapêuticas de custos mais baixos em relação a medicamentos industrializados (ISRAELSON, 1991).

Além disso, após o reconhecimento de patente pelo governo brasileiro (BRASIL, 1996), o estudo de plantas medicinais com o objetivo de isolar e identificar moléculas bioativas, novas ou não, tem sido de interesse vital para o desenvolvimento científico, tecnológico e econômico do país na descoberta de novos fármacos. Nesse contexto, substâncias de origem natural com ação antimicrobiana podem ser de interesse na prevenção e controle da doença cárie.

3.4 *Mikania* sp.

Dentre as inúmeras plantas de interesse, destacam-se as espécies *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania hirsutissima* DC, conhecidas popularmente como “guaco” ou “guaco cheiroso” e “cipó-cabeludo” ou “guaco cabeludo”,

respectivamente, sobressaindo-se entre outros produtos naturais, devido as suas propriedades antimicrobianas contra bactérias orais (CECANHO et al., 1998, 1999, YATSUDA et al., 2005).

As plantas da espécie *M. glomerata* Spreng se distribuem pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai, Uruguai). No Brasil, ocorrem principalmente nas regiões sul e sudeste. Desenvolvem-se como trepadeiras arbustivas, lenhosas, apresentando caule cilíndrico e ramoso. A *M. hirsutissima* DC é também conhecida popularmente como “erva dutra” e “cipó-almécega-cabeludo”. Essa espécie difere das outras espécies de *Mikania* por possuir folhas pilosas, além de produzir uma resina de cheiro semelhante à resina de almécega (COSTA, 1972). Também cita-se a presença de óleo essencial, taninos (CRUZ e LIBERALLI, 1938) ácidos caurenóico e 16-hidro-caurenóico, cumarina e sesquiterpenos (OHKOSHI et al., 1999, RODRIGUES, 1998). O “cipó cabeludo” é usado extensamente na medicina brasileira para tratar desordens do sistema renal (diurético), blenorragia, diarreia, reumatismo e gota (CRUZ, 1995). Um composto cíclico isolado, chamado por micaniahumuleno, apresentou inibição *in vitro* de células leucêmicas de rato (FUJIMOTO, 1995).

O gênero *Mikania* possui cerca de 400 espécies, sendo que aproximadamente 10% destas foram estudadas quimicamente (CASTRO, JAKPOVIC e BOHLMANN, 1986) especialmente as espécies *laevigata* e *glomerata*. Trabalhos desenvolvidos por Cecanho et al. em 1998 e 1999, demonstraram que o extrato bruto da *M. laevigata* apresenta atividade antimicrobiana e é capaz de inibir *in vitro* a aderência celular de *S. sobrinus*. Estudos recentes desenvolvidos por Yatsuda et al. (2005) demonstraram que os extratos brutos e as frações (acetato de etila e hexânica) tanto da *M. laevigata* quanto da *M. glomerata* apresentam atividade antimicrobiana e são capazes de inibir *in vitro* a aderência celular de microrganismos do grupo mutans, em baixas concentrações, sugerindo que a mesma tem potencial anticariogênico. Os extratos que apresentaram maior atividade antimicrobiana para ambas espécies de *Mikania* foram os hexânicos, indicando que o(s) componente(s) farmacologicamente ativo(s) contra os microrganismos testados possui(em) característica(s) apolar(es) (YATSUDA et al., 2005).

Análises fitoquímicas dos diferentes extratos e frações de *M. laevigata* e *M. glomerata*, já foram isoladas e identificadas até o momento pelo CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP,

Paulínia, SP), destacando-se a cumarina, o ácido caurenóico, o ácido cupressênico, o caurenol, o ácido grandiflórico e seus derivados, o espatulenol, o eicosano, os ácidos de cadeia longa, o caurenol, dentre outros. Estudos também realizados por REHDER et al. (2002), demonstram que tanto a *M. laevigata* quanto a *M. glomerata* apresentam semelhanças químicas qualitativas, entretanto sendo diferentes quando analisadas quantitativamente. Dentre as principais diferenças podemos destacar a presença predominante de cumarina na *M. laevigata*, além de compostos diterpênicos, enquanto na *M. glomerata* há prevalência dos compostos diterpênicos. Assim, não se faz necessário o estudo de ambas as espécies, pois apresentam os mesmos compostos, ocorrendo variação apenas quantitativa (REHDER et al., 2002).

Considerando que a *Mikania* possui compostos bioativos promissores para o controle da doença cárie (YATSUDA et al., 2005), estudos foram realizados para a identificação e isolamento destes compostos responsáveis pelas ações antimicrobiana e inibitória da aderência celular. Esses estudos são necessários para a descoberta de novos produtos naturais ou compostos químicos isolados com atividade antibacteriana, antiplaca e com menores efeitos adversos que os produtos industrializados já existentes. Posteriormente, outras investigações utilizando modelos *in vivo* (animais e humanos) deverão ser realizadas a fim de se comprovar o efeito antimicrobiano destes compostos.

4 Relatório do trabalho de campo

O Projeto de Pesquisa: **Atividade antimicrobiana e antineoplásica de alguns produtos naturais** iniciou seu desenvolvimento no mês de abril de 2004 pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Dentística. A realização do presente projeto se deu nos Laboratórios de Microbiologia Oral e no Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia, no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia assim como no Laboratório de Bioquímica no Instituto de Química e Geociências, desta forma podendo o bolsista atuar de forma interdisciplinar e interdepartamental. Esta atuação em diferentes áreas de pesquisa permitiu uma ampla atuação e participação deste em diversas linhas de pesquisa, além do trabalho em questão, conforme se pode observar nos resumos apresentados em congressos e artigos publicados em periódicos posteriormente relacionados.

Durante a realização das disciplinas obrigatórias para obtenção do título requerido, no primeiro ano foi realizada a revisão bibliográfica a respeito do tema proposto. Assim como neste mesmo ano se fez um projeto piloto para avaliar as condições para realização do experimento.

No segundo ano foram obtidos os primeiros produtos a serem estudados, plantas e os cogumelos, assim como iniciou-se a confecção dos extratos para serem testados. Conjuntamente foi realizado um treinamento junto à equipe do prof. Pedro Luiz Rosalen, para aprendizagem das técnicas a serem aplicadas nos ensaios antimicrobianos.

Nos dois anos seguintes outros produtos naturais foram adquiridos para confecção de extratos. Sendo posteriormente realizados testes não só frente aos microrganismos patogênicos da cavidade bucal como também em células (neoplásicas e não-neoplásicas) para observação de toxicidade.

No ano de 2006, durante a Qualificação para Doutorado foi sugerido pela banca examinadora, que fosse realizado um estudo de levantamento da frequência de Candidíase Atrófica Crônica (CAC) na Faculdade de Odontologia, dentre os pacientes atendidos no CDDDB, e isolamento da levedura para posterior identificação das espécies. Portanto do período de novembro de 2006 a novembro de 2007 foram avaliados os pacientes atendidos no CDDDB com lesões compatíveis com CAC que responderam um questionário (ANEXO) e assinaram o termo de consentimento livre

e esclarecido para participação no projeto. Previamente, tal projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa e foi aprovado.

Finalmente, a partir de novembro de 2007 os resultados obtidos com as coletas de material da mucosa oral dos pacientes com CAC atendidos no CDDB e com os questionários respondidos, passou-se a análise estatística dos resultados para verificação se houve ou não relação entre o isolamento da levedura causadora de CAC com os fatores predisponentes analisados. E ao acrescentar os resultados previamente observados com a primeira etapa do projeto de doutorado seguiu-se para a confecção da tese.

O trabalho de avaliação da atividade antifúngica do extrato hidroalcolico de *Mentha arvensis* L. já está sendo realizado com as leveduras de *Candida* isoladas de pacientes com CAC, conforme foi sugerido na defesa de qualificação do projeto de tese. A extração a partir das folhas de *Mentha* já foi realizada e os ensaios antifúngicos já estão sendo concluídos.

Com relação às avaliações da atividade antineoplásica dos extratos de *Jodina rhombifolia* (“cancorosa-de-3-pontas”) e da *Carapa guianensis* (“andioba”), os ensaios também estão sendo concluídos com resultados promissores contra as linhagens tumorais, sendo considerados potenciais quimioterápicos naturais. O fracionamento desses extratos está sendo realizado e novos experimentos serão realizados com as suas frações. O extrato aquoso de *Lentinula edodes* foi previamente testado em ensaio contra linhagens celulares neoplásicas e não demonstrou nenhum efeito citotóxico ou antiproliferativo. Estes ensaios estão sendo repetidos, juntamente com o extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis*.

A seguir, seguem as citações dos artigos em periódicos e resumos em anais apresentados durante o período de realização do doutorado.

Resumos e Artigos confeccionados no período:

Artigos em Periódicos

LUND, R.G., SEHN, F.P., PIVA, E., DETONI, D., MOURA, F.R.R., CARDOSO, P.E.C., DEMARCO, F.F. Clinical Performance and Wear Resistance of Two Compomers in Posterior Occlusal Restorations of Permanent Teeth: Six-Year Follow-Up. **Operative Dentistry**. v.32, p.118 - 123, 2007.

DEMARCO, F.F., CENCI, M.S., PEREIRA, C.L., **LUND, R.G.**, CARVALHO, R.M. One-year comparison of metallic and translucent matrices in Class II composite resin restorations.

American Journal of Dentistry. v.20, p.41 - 45, 2007.

MOURA, F.R.R., ROMANO, A.R., DEMARCO, F.F., **LUND, R.G.**, BRAGHINI, M., RODRIGUES JÚNIOR, S.A. Demographic, Socio-economic, Behavioural and Clinical Variables Associated with Caries Activity. **Oral Health And Preventive Dentistry**. v.04, p.129 - 135, 2006.

MARTOS, J., GASTAL, M.T., SOMMER, L., **LUND, R.G.**, DEL PINO, F.A.B., OSINAGA, P.W.R. Dissolving efficacy of organic solvents on gutta-percha. **Journal of Oral Rehabilitation**. , v.10, p.50 - 54, 2006.

MARTOS, J., GASTAL, M., SOMMER, L., **LUND, R.G.**, DELPINO, F.A.B., OSINAGA, P.W.R. Dissolving efficacy of organic solvents on root canal sealers. *Clinical Oral Investigations*. , v.10, p.50 - 54, 2006.

Resumos apresentados em eventos (ANAIS):

NASCENTE, P.S.; SANTIN, R.; FEIJO, A. M.; BUENO, M. E.; CLEFF, M. B. ; **LUND, R.G.**; MEIRELES, M. C. A. Leveduras isoladas em ambiente de UTI. **44º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2º Encontro de Medicina Tropical do Conesul, 3º Encontro de MT de países de Língua Portuguesa**, Porto Alegre. Anais do 44º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2008.

DESTRI, K.; BAIROS, J.; VARGAS, B.L.; **LUND, R.G.**; NASCENTE, P.S. Análise microbiológica de doce de leite vendido em feira livre. **XVI Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas. 2007.

VARGAS, C.G.; SILVA, C.C.; **LUND, R.G.**; GONZALES, H. L.; NASCENTE, P.S. Isolamento de *Staphylococcus* sp. em leite in natura com resultado CMT positivo. **XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS**, Pelotas. 2007.

BUENO, M.E.; FEIJO, A.M.; SANTIN, R.; **LUND, R.G.**; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. *M. pachydermatis* e outras leveduras em ambiente de UTI. **XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS**, Pelotas. 2007.

RODRIGUES, P.B., BOLEK, R. F., OLIVEIRA, L. J. C., SILVA, V.M., **LUND, R.G.**, DEL PINO, F.A.B. A concentração de flúor no leite materno: risco de fluorose? - Estudo-piloto **XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS**, Pelotas. 2007.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; LUND, R.G.; **NASCENTE, P.S.**; DEL PINO, F. Estudo *in vitro* do potencial antifúngico do extrato aquoso de *Arctium lappa* L. sobre espécies do gênero *Candida*. **XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS**, Pelotas. 2007.

MEINCKE, D.K.; **LUND, R.G.**; NASCENTE, P.S.; ETGES, A.; RIBEIRO, G.A.; DEL-PINO, F.A. B. Isolamento de *Candida* spp. Em pacientes com candidíase atrófica Crônica. **XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS**, Pelotas. 2007.

NASCENTE, P.S.; **LUND, R.G.**; FEIJO, A.M.; BUENO, M.E.; Del Pino, F.; MEIRELES, M.C.A. Isolamento e identificação de *Candida* sp na mucosa oral de pacientes internados no Hospital Universitário da UFPel. **24º SBPqO, Atibaia. SBPqO Annual Meeting**, v. 21. p. 284-284, 2007.

TEIXEIRA, J. M.; **LUND, R.G.**; BUENO, M. E.; FEIJO, A. M.; NASCENTE, P.S.; Del PINO, F. Espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral em crianças. **24º SBPqO, Atibaia.**

SBPqO Annual Meeting, v.21. p.71-71, 2007.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; **LUND, R.G.**; NASCENTE, P.S.; Del PINO, F. Atividade antifúngica *in vitro* do extrato aquoso de *Arctium lappa* L. (Asteraceae) sobre espécies do gênero *Cândida*. **24º SBPqO, Atibaia. SBPqO Annual Meeting**, v. 21. p. 105-105, 2007.

MEINCKE, D. K.; **LUND, R.G.**; NASCENTE, P.S.; Del Pino, F.; ETGES, A.; RIBEIRO, G.A.; SOUSA, E.L.R.; ROSALEN, P. L. Ocorrência e Identificação de espécies de *Candida* em pacientes com Candidíase Atrófica Crônica. **24º SBPqO, Atibaia. SBPqO Annual Meeting**, 2007. v. 21. p. 138-138.

LUND, R.G.; DEL PINO, F.; SERPA, R.; RIBEIRO, G.A.; ROSALEN, P.L.; NASCENTE, P.S.; nascimento, J.S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Agaricus brasiliensis* (Agaricaceae) contra estreptococos orais. **24º SBPqO, Atibaia. SBPqO Annual Meeting**, v.21. p.241-241.

SANTIN, R.; **LUND, R.G.**; CLEFF, M.B.; MUELLER, E.N.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; SCHUCH, L.F.D.; NASCENTE, P.S. Leveduras isoladas da mucosa oral de cães. **XVI Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas. 2007.

NASCENTE, P.S.; BAIRROS, J.; DESTRI, K.; VARGAS, B.L.; **LUND, R.G.** Bolores e leveduras em queijos tipo minas produzidos artesanalmente e comercializados em feira livre. **5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

NASCENTE, P.S.; SANTIN, R.; **LUND, R.G.**; BUENO, M.E.; FEIJO, A.M.; CLEFF, M.B.; MEIRELES, M.C.A. Leveduras isoladas em ambiente de UTI - estudo preliminar. **5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

SANTIN, R.; **LUND, R.G.**; CLEFF, M. B.; MUELLER, E.N.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; SCHUCH, L.F.D.; NASCENTE, P.S. Isolamento de leveduras da cavidade oral de cães. **5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

LUND, R.G.; SANTIN, R.; LELLING, J.S.; MATTEI, A.S.; MEIRELES, M.C.A.; Del Pino, F.; NASCENTE, P.S. Comparação entre duas técnicas para isolamento de leveduras obtidas de mãos. **5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; SANTIN, R.; NASCIMENTO, S.L.; DOURADO, A.; DOURADO, M. In vitro antifungal activity of the *Braccharis trimera* (carqueja) essential oil against yeasts. **5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; **LUND, R.G.**; NASCENTE, P.S.; FONSECA, A.L.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B.; RODRIGUES, M.R.A. Efeito fungistático do óleo de *Origanum vulgare* frente a cepas de *Candida* isoladas de cães. **III Simpósio de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos / I Simpósio de Resistência a Quimioterápicos**, Rio de Janeiro – Brasil, 2006.

LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; SERPA, R.; BRISOLARA, G.F.; RIBEIRO, G.A.; MEIRELES, M. C. A., FREITAG, R., DEL PINO, F., RODRIGUES, M. R., MELLO, J.R.B. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcolícos de *M. arvensis* L. frente a microrganismos orais. **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Salvador. 2006.

CLEFF, M.B.; NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; **LUND, R.G.**; BRISOLARA, G.F.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M. R.; MELLO, J.R.B. Comparação da atividade antifúngica de dois quimiotipos do óleo essencial do *Origanum vulgare*. **XIX Simpósio de**

Plantas Medicinais do Brasil, Salvador. 2006.

FEIJÓ, A.M.; **LUND, R.G.**; NASCENTE, P.S.; SERPA, R.; BUENO, M.E.N.; RIBEIRO, G.A.; FREITAG, R.A.; DEL PINO, F.A.B. Estudo do efeito antimicrobiano dos extratos etanólicos de *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) sobre patógenos orais. **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

SILVA, V.M., DUARTE, A., MARON, A.S., **LUND, R.G.**, HASAN, N.H.M., LIMA, D.M., DEL PINO, F.A.B. Comparação metodológica no heterocontrole dos teores de fluoreto em diferentes marcas de águas minerais comercializadas no município de Pelotas. **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

LIMA, D.M., DUARTE, A., SILVA, V.M., MARON, A.S., **LUND, R.G.**, HASAN, N.H.M., DEL PINO, F.A.B. Monitoramento dos níveis de fluoreto nas águas de abastecimento público do município de Rio Grande-RS **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

DUARTE, A., SILVA, V.M., MARON, A.S., LIMA, D.M., HASAN, N.H.M., DEL PINO, F.A.B., **LUND, R.G.** Monitoramento dos níveis de fluoreto nas águas de abastecimento público de Pelotas – RS **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

SERPA, R., CASTELLI, R.M., **LUND, R.G.**, DEL PINO, F. A. B., MAYUMI, A.A., ROSALEN, P.L., REHDER, V. L. G., RIBEIRO, G.A. Análise do potencial antibacteriano de duas espécies de Mikania (Lamiaceae) **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

SERPA, R., RODRIGUES, G.C., **LUND, R.G.**, RODRIGUES, M.R.A., RIBEIRO, G.A. Análise da atividade antimicrobiana de *Planytago australis* Lam. frente a isolados alimentares. **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

SERPA, R., CASTELLI, R.M., **LUND, R.G.**, DEL PINO, F.A.B., MAYUMI, A.A., ROSALEN, P.L., REHDER, V. L. G., RIBEIRO, G.A.. Avaliação da atividade antifúngica de duas espécies do gênero Mikania. **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

LUND, R.G., SERPA, R., YATSUDA, R., RIBEIRO, G.A., REHDER, V.L.G., ROSALEN, P.L., DEL PINO, F.A.B. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Mikania sobre estreptococos orais. **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

SERPA, R., CASTELLI, R.M., **LUND, R.G.**, FREITAG, R.A., DEL PINO, F.A.B., RIBEIRO, G.A. Avaliação das propriedades antimicrobianas da cavalinha (*Equisetum arvense* L). **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

MUSA, S. H., HASAN, N.H.M., SILVA, V.M., **LUND, R.G.**, DEL PINO, F.A.B. Controle bienal dos teores de flúor presentes em diferentes marcas de águas minerais comercializadas em Pelotas **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

BARBOSA, R. P. S., HECKMANN, S.S., **LUND, R.G.**, DEMARCO, F.F., PIVA, E. Estudo clínico longitudinal comparando duas terapias para hipersensibilidade dentinária **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

MARON, A.S., SILVA, V.M., DUARTE, A., LIMA, D.M., HASAN, N.H.M., **LUND, R.G.**, DEL PINO, F. A. B., RECH, J.L. Comparação entre dois métodos para análise de flúor na água de abastecimento público de Pelotas-RS **XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-Graduação**, 2006.

LUND, R.G., YATSUDA, R., SERPA, Rosana, RIBEIRO, Gladis Aver, REHDER, V. L. G., ROSALEN, Pedro Luis, KOO, H., DEL PINO, F. A. B.
Estudo in vitro da ação antimicrobiana de duas espécies do gênero Mikania (Asteraceae) sobre estreptococos orais. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. São Paulo - SP: SBPqO, 2006. v.20. p.227 - 227

HASAN, N.H.M., SILVA, V.M., **LUND, R.G.**, DELPINO, F.A.B.
Avaliação bienal do teor de flúor em vinte marcas comerciais de águas minerais. **23º SBPqO, Atibaia. SBPqO Annual Meeting**, v.20.

Artigo 1

Title Page

Occurrence, isolation and differentiation of Candida spp. in patients with clinical manifestations of Chronic Atrophic Candidiasis (CAC) and factors associated

Candida sp. in CAC and prevalence of variables

Rafael Guerra Lund^{a,*}, Patrícia da Silva Nascente^b, Adriana Etges^a, Gladis Aver Ribeiro^c,
Pedro Luiz Rosalen^d, Francisco Augusto Burkert Del Pino^a

^a*Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel) – Gonçalves Chaves Street, 457 / 504, Zip code: 96015-560, Pelotas, RS, Brazil*

^b*Department of Preventive Veterinary, School of Medicine Veterinary, Federal University of Pelotas (UFPel)*

^c*Department of Microbiology and Parasitology, Biology Institute, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil*

^d*Department of Physiological Sciences, Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil*

* Adress all correspondence to Rafael Lund, Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel)– Gonçalves Chaves Street, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel/Fax: +55 53 3222-6690; E-mail: rafael.lund@gmail.com

ABSTRACT

Objective. The purpose of this study was to survey the frequency of *Candida* sp. in patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis (CAC), identify the *Candida* species and to assess variables associated. **Methods.** Patients wearing partial or full denture with denture stomatitis treated in a Brazilian dental school. Data were obtained by (1) a questionnaire including the identification of the subject, demographic, medical history and behaviour; (2) intra-oral examination; (3) mycological examination, (4) yeast identification and (5) analyses using Stata and the Fischer's exact test. The sample's collect was carried out frictioning sterilized swabs in the palate's mucosa, tongue or both of them. The samples were seeded in Agar Sabouraud Dextrose with 100mg/mL of chloramphenicol and incubated at 37°C for 24-48h. The presumptive identification of *Candida* species was based on the morphologic characteristics and Gram colorization of the yeasts, and it was confirmed by CHROMagar. **Results.** Forty-four (53%) cases of CAC from eighty-three patients, which confirmed *Candida* growth, showed the presence of *C. albicans*. CAC occurred more frequently in females (75.2%), wearing total denture (60.1%), for more than 10 years (58%). **Conclusions.** 1) The results did not confirm a significant difference between patients with of denture stomatitis concerning the presence or absence of yeasts; 2) the occurrence of *Candida* in patients with CAC was negatively related to important factors associated to this opportunistic infection; and 3) mycological findings from the present study do not indicate that the covariates investigated have a significant effect on oral infection by *Candida* sp.

Keywords: denture stomatitis; oral candidiasis; *Candida*; cross-sectional studies

Introduction

The oral candidiasis is a common opportunistic infection of the oral cavity caused by an overgrowth of *Candida* species, the commonest being *Candida albicans*. It is underdiagnosed among the elderly, and particularly in those who wear dentures and many cases is avoidable with a good mouth care regimen. It affects about 50% of the patients wearing upper total prosthesis [1] and it has a multifactorial aethiology. It can also be a mark of systemic disease, such as diabetes mellitus and it is a common problem among the immunocompromised.

The oral candidiasis has several clinical presentations that have been object of numerous classifications, as that proposed by Lehner [2] which is the most adopted [3]. The *Chronic Atrophic (Erythematous) Candidiasis* also known as “denture stomatitis” is characterized by localized chronic erythema of tissues covered by dentures. The most common site of “Chronic Atrophic Candidiasis” is the hard palate under a denture, but it may also be found on the dorsal tongue and other mucosal surfaces. Diagnosis requires removal of dentures and careful inspection; swabs may be taken for confirmation [4].

The most common etiology is poor denture hygiene, and/or continuous denture insertion, but it may also be caused by immunosuppression, xerostomia, or antibiotic therapy. This condition is characterized by varying degrees of erythema, such as petechial hemorrhage, diffuse erythema, red macules and / or diffuse erythema, sometimes accompanied by micropapules (papillary hyperplasia) localized to the denture-bearing areas of a maxillary removable dental prosthesis [4, 5].

Median rhomboid glossitis is a form of chronic atrophic candidiasis characterized by an asymptomatic, elongated, erythematous patch of atrophic mucosa of the posterior mid-dorsal surface of the tongue due to a chronic *Candida* infection.

A concurrent "kissing lesion" of the palate is sometimes noted. Specific predisposing etiologic factor(s) for median rhomboid glossitis have not been clearly established.

The oral candidiasis incidence varies depending on age and certain predisposing factors. Risk factors can be systemic or local and they include: impaired salivary gland function, drugs, dentures, high carbohydrate diet, and extremes of life, smoking, diabetes mellitus, Cushing's syndrome, malignancies, and immunosuppressive conditions [6, 7].

The diagnosis of candidiasis in clinical practice is usually established by the clinical signs of in conjunction with exfoliative cytologic examination. However, the definitive identification of the organism can be made by means of culture. A specimen for culture is obtained by rubbing a sterile cotton swab over the lesion and then streaking the swab on the surface of a Sabouraud's agar slant. Yeasts of genus *Candida* spp. will grow as creamy, smooth-surfaced colonies after 24-48h of incubation, and the optimal temperature for its growing is about 37°C [3, 8-10].

There are several specific tests for identification of *Candida* species: germinative tube test or filamentation, chlamydospores formation, in the presence of culture media containing Harina-Agar de Maiz or Rice-Agar with Tween 80; use of carbon compounds for fermentation or assimilation; nitrogen compounds assimilation; growing in high temperature, resistance to cicloheximide and urea hydrolysis, growing in chromogenic medium (CHROMagar) and systems for metabolic studies such as API20C, Vitek, Microscam, ID32C, which allow to identify the yeasts with more precision and sensitivity than the conventional methods [8,10].

Whether Chronic Atrophic Candidiasis represents actual infection by *C. albicans* or is simply a tissue response by the host to the various microorganisms living beneath the denture remains controversial [3, 11].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the occurrence of *Candida* sp. in patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic candidiasis; identify and differentiate the *Candida* species isolated from the oral cavity into two categories: *C. albicans* and Non-*Candida albicans* and assess the association between yeast isolation and *Candida* species with the other variables investigated.

Materials and methods

Demographic data's questionnaire

A cross-sectional population-based study was carried out in the Center of Diagnosis of Mouth Diseases (CDMD), Pelotas Dental School, Rio Grande do Sul, Brazil from November 2006 to November 2007. All denture wearer patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis (CAC) and who were interested in participating were included in this study. People meeting the inclusion criteria (Table 1) were then individually asked if they wished to participate and, if so, were invited to sign and informed consent. The study and the consent form were approved by the Ethics Committee of Pelotas Dental School (Document no. 036/2006). All volunteers were clinically examined about their clinical manifestation of denture stomatitis. All variables (appearance of the denture stomatitis, common sites of erythematous zone at palate, type of dental prostheses, time of denture use, cleansing of dentures, nocturnal denture wear, diabetes mellitus, smoking and stomatitis) were collected by face-to-face interviews using a standardized questionnaire.. Individuals who returned more than once answered the questionnaire only once.

Examination of the oral cavity of each patient and interviews were performed by two undergraduate students and one PhD student that were previously submitted to training and calibration sessions for a standardized oral pathologist. They were trained for 4 hours through

slides of several clinical cases about Chronic Atrophic Candidiasis, simulated interviews, household approaching techniques discussion, reading and explanation of the questionnaires instructions and role-play exercises. The quality control of data collection comprised the follow-up of the fieldwork supervisors to 10% of the sample, randomly assigned.

Intra-oral examination

Soft tissue examination was undertaken by using a mouth mirror and gauze compresses for the examination. Data were recorded on the patients' questionnaire. The diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis was made according to traditional criteria [3].

Mycological examination

This study was carried out in the Laboratory of Oral Microbiology at the Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas city, RS, Brazil.

The collection of the samples was carried out spreading sterilized swabs in the palate's mucosa, tongue or both of them. The specimens were seeded in Agar Sabouraud Dextrose with 100mg/mL of chloramphenicol and they were incubated at 37°C for 24-48h. After the isolation of the yeast, the macromorphologic analysis was carried out with the observation of the colonies and the micromorphology analysis was done with the smear of the colonies and posterior Gram coloration, visualized under light microscopy (1000X) [8,10].

Yeast identification

The characterization of the *Candida* species was carried out with the following steps: a) microcultiive test in ágar fubá which also promotes the micromorphologic study aiming the visualisation of clamidoconides, further hiphaes e pseudo hiphaes, b) isolation in CHROMagar® *Candida*, a sensitive and specific method afor presumptive identification of

yeast species most commonly isolated of genus *Candida* and c) growth in hypertonic broths. The identification was presumptive and was based on the morphologic characteristics and Gram colorization of the yeasts and seeded at 36°C for 24-48 hours on chromogenic agar (CHROMagar® *Candida*- France) [12,13].

The medium CHROMagar® *Candida* (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) comprised (per liter) peptone (10.2g), glucose (20g), agar (15g), chloramphenicol (0.5g), and a “chromogenic mix” (22g). It was supplied as a white powder in preweighed batches for the preparation of 1,000-mL volumes and was prepared according to manufacturer’s instructions. This entailed stirring the powder into distilled water and heating the mixture to the boiling point, with continuous stirring, to dissolve the powder. The medium, which does not require sterilization by autoclaving, was dispensed in petri dishes being left to cool slightly.

Data analyses

The outcomes consisted in interview, clinical examination, collect of samples, isolation of yeast *Candida* from patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis in Agar Sabouraud medium; and presumptive identification of *Candida* species in those patients with the yeast growth by a chromogenic medium (CHROMagar® *Candida*).

Regarding to the questionnaire, the variables were coded by the interviewers, and the research coordinator reviewed the work. Excel software was used to double enter the data. Data analyses were undertaken with *Stata Statistical Software* - version 8.0.

The descriptive analysis included calculation of prevalence for each variable, means and standard deviations. Crude associations were evaluated by Exact Fischer’s test and these analyses followed a hierarchical modeling strategy, including occurrence of yeast *Candida* in the first step and the species of *Candida* differentiated in the second step.

Results

Demographic data's questionnaire

One hundred and forty three patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis (CAC), who were interested in participating of this study and in accordance with the inclusion criteria, were included in this study. People meeting the inclusion criteria were examined in the Center for Diagnosis of Mouth Diseases (CDMD), Pelotas Dental School, Rio Grande do Sul, Brazil, from November 2006 to November 2007. Oral swabs of these patients were collected for microbiological analyses.

Thirty-two (24.8%) of the patients treated were male and the majority (n=111, 75.2%) were female, with mean age of 58.8 ± 13.6 years. Aproximately half of the patients (53.8%) wore full dental prosthesis, while 39.9% wore removable partial dental prosthesis and 6.3% used both types of prosthesis. For criteria of statistical analysis data were grouped in two categories: group 1: Until 10 years of use, and group 2: more than 10 years of use. Fifty-eight percent of the patients (N=83) wore prostheses for more than 10 years and 42% up to 10 years (N=60) (Table 2). Some dentures of these patients were constructed in the Dental School, other ones not, and there was no information about the instructions issued at the time of its insertion.

Although the clinical appearance can be striking, the erythematous candidiasis was rarely symptomatic in the patients (4.9%). Usually the patients admitted to wearing the denture continuously, removing it only periodically to clean it (97.9%).

Intra-oral examination

Regarding to the site of the erythematous lesion, denture stomatitis was most frequent on all palate-denture bearing mucosa (63.3%), followed by anterior hard palate (57.6%). Aiming to improve the statistical analysis of prevalence of the erythematous lesion's site, the sites "junction of the hard and soft palate" and "buccal mucosa" were grouped with "all palate-denture bearing mucosa". Taking in account just the clinical cases where there was *Candida* isolation from the lesion of denture stomatitis, the central hard palate is the most common site of denture stomatitis (71.4%) than the "all palate-denture bearing mucosa" site.

Mycological analyses

In the culture, after 24-48 h of incubation, it was observed cream colonies, with cream consistency, whose cells showed Gram positive yeasts-like cells, circular or egg-shaped aspect and with presence of pseudo-hyphae.

In the microbiological analyses, it was observed the isolation of yeasts *Candida* genus in 58% (n=83) of the patients, with female responding for 77.1% (N=64) of the them.

Yeast identification

A total of 83 isolates were screened for their abilities to grow and for their colony colors on CHROMagar *Candida*. Among the *Candida* species detected, they include: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dublinensis* and *Candida* sp. These were grouped into two categories: *Candida albicans* and Non-*Candida albicans*. Then, it was isolated 44 samples (53%) of *Candida albicans* and 39 samples of Non-*Candida albicans* (47%).

Data analyses

Table 2 presents the distribution of *Candida* isolation from patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis and differentiation of *Candida* species according

to the covariates. There was no significant difference ($p>0.05$) when comparing the isolated yeast *Candida* and the other covariates associated to denture stomatitis (Table 2).

The prevalence of being *Candida* yeast isolated from stomatitis lesion did not differ by appearance of the denture stomatitis, common sites of erythematous zone at palate, type of dental prostheses, time of denture use, cleansing of dentures, nocturnal denture wear, diabetes mellitus, smoking and stomatitis. No statistically significant relation was found between presence of stomatitis and occurrence of one or more species of *Candida* or simply the presence of this yeast.

Discussion

Chronic Atrophic Candidiasis, or simply denture stomatitis, is one of the denture-related oral mucosal lesions which is characterized by chronic reactions to denture plaque, yeast, constituents of the denture based material, poor retention and mechanical injury. Literature on specific denture-related oral mucosal lesions usually reports the mean frequency in the population surveyed and the ages in which it is most frequent these frequencies change with the type of denture or length of denture use [14].

In this study it was observed that *Candida* sp. was isolated in 58% (N=83) from the patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis due the actual infection by *C. albicans* or simply a tissue response by the host to the various microorganisms, living beneath the denture remains controversial. In this study, no statistically significant relation was found between presence of stomatitis and occurrence of one or more species of *Candida* or simply the presence of this yeast.

On the other hand, some limitations may have affected the results of this study. The sample size of this investigation (N=143) could not be large enough to guarantee the accuracy

of the prevalences investigated because it was carried out in a Center of clinical diagnosis for mouth diseases from a Public Brazilian Dental School where the number of patients assisted during one year was small and limited, and because the time of study which was of one year. According to Table 2, for example, it would be possible to estimate a significant prevalence *Candida* species isolated in the association with the variable 'smoking', if the sample size could be higher. Other limitation lies in the validation of the instrument used, whose microbiological collection is less invasive than an exfoliative citologic preparation or a biopsy specimen where tissue sections could be obtained. Nevertheless, there are reasons to believe that this method of collect is valid, because significant findings have been found about individuals clinically diagnosed as affected by denture stomatitis and without *Candida* isolation, attaining a requirement of this model confirmed by previous data in literature [11, 15, 16]. Thus, clinician must be aware that a microbiological test should be carried out before establishing the treatment to avoid an overtreatment.

The clinician should also rule out the possibility that this reaction could be caused by improper design of the denture (which could cause unusual pressure on the mucosa), allergy to the denture base or inadequate curing of the denture acrylic [3].

In this study, the number of females recruited to participate in this cross-sectional study was higher than males. Sex differences have been shown in many studies on oral health. This male-female difference may reflect a higher proportion of females in a population [17]. It was also reported that males are less concerned about their edentulism, less likely to opt for restorations and less likely to visit a dentist than females [18]. Furthermore, there are reports that the prevalence of denture stomatitis is also greater in female denture-wearers [19].

CHROMagar *Candida* is a medium well-suited for medical mycological use, which allows the presumptive distinction of *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* from other species of clinical interest. It can serve as a primary isolation and differentiation medium for

clinical specimens likely to contain yeasts and also as an adjunctive differential medium for the identification of yeasts isolated on other media. This chromogenic medium has the advantages of supporting the growth of yeasts but not of bacteria, and facilitating the recognition of specimens containing mixtures of yeast species. Moreover, the exposure of the fungi to the differential indicator substances does not affect their viabilities for subsequent subcultures [12].

These yeasts can be found forming part of the normal microbiota from the oral cavity (tongue, palate and buccal mucosa), from the digestive tract (stomach and intestine), from the vagina (at least in 30%) and be present in the environment [7]. Generally, only some species can be frequently isolated from the clinical samples preceded from infections. *C. albicans* is the most isolated species from the oral cavity of patients with more than 60 years old and denture wearers. In a study of Resende et al. [7], from a total of 75 isolates obtained from the oral cavity of patients, 47 (62.67%) were identified as *C. albicans*, 15 (20%) as *C. tropicalis*, seven (9.33%) as *C. glabrata*, four (5.33%) as *C. parapsilosis* and two (2.67%) as *C. guilliermondii*. Other studies, such as those of Fanello et al. [20], Penha et al. [21] and Yokoyama et al. [22] also revealed that in prosthesis-wearer patients, the ratio of *C. albicans* species and non-*albicans Candida* is very high, although a crescent frequency of non-*albicans Candida* species had been reported in the last decades (23, 24). In this study, it was observed that 53% (N=44) of the yeast species were *Candida albicans*, 33.7% (N=28) were Non-*albicans Candida* and 13.3% (N=11) were associations of *Candida* species.

The prevalence of denture stomatitis is significantly associated with denture use. Although denture stomatitis is significantly related to denture use, some non-users presented this alteration. In this study, five patients were excluded because they were not denture wearers (see Table 1). Other minor risk factors associated with denture stomatitis such as

smoking, diabetes mellitus, antibiotic therapy, immune deficiencies, vitamin A, folate and iron deficiencies, impaired salivary gland function could explain this result [16].

The occurrence of *Candida* in patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis and the differentiation of *Candida* species isolated were negatively related to important factors associated to this opportunistic infection.

Interpretation of the associations between the isolation of *Candida* from denture stomatitis lesions clinically diagnosed, differentiation of *Candida* species and the covariates should consider the study design. As all variables were measured simultaneously, their interrelationship does not necessarily reflect a causal association. Nevertheless, the present study was designed to determine prevalence and characteristics of individuals with reliable clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candididasis but with the presence or absence of its aetiologic agent: the yeast *Candida* sp. However, the sample size of this study could be small and limited to estimate these prevalences and covariate associations.

Further, the extrapolation of the results to other populations should be made with caution. More studies from different areas of Brazil and from other developing countries are needed to know if the data can be really generalized to other settings.

These findings suggest that: 1) the results did not confirm a significant difference between patients with clinical diagnosis of denture stomatitis concerning the presence or absence of *Candida* yeasts; 2) the occurrence of *Candida* in patients with clinical diagnosis of Chronic Atrophic Candidiasis was negatively related to important factors associated to this opportunistic infection; and 3) mycological findings from the present study do not indicate that the covariates investigated have a significant effect on oral infection by *Candida albicans* or other species of *Candida* genus.

Acknowledgements

The authors are very grateful to all participants in this trial, as well as to the PhD student Samuel Dumith for the statistical analysis. This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and CAPES. The PhD student Rafael Lund was supported by the Brazilian Agency CAPES.

References

- [1] Wilson, J The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *British Dental Journal* 1998;185:380-384.
- [2] Lehner, T Classification and clinico-pathological factors features of *Candida* infections in the mouth. In.: *Simposium on Candida infection*. Eds. HI. Winner and R. Hurley. Churchil Livingstone. London. 1967.
- [3] Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquet JE *Oral & maxillofacial pathology*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders Company; 2001.
- [4] Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. *Postgrad Med J* 2002;78:455-459.
- [5] Newton, A V Denture sore mouth a possible etiology. *British Dental Journal* 1962;112:357.
- [6] Resnik, DA Perspectives – Oral manifestations of HIV disease. *Topics in HIV Medicine* 2005;13(5):143-148.
- [7] Resende, MA, Sousa, LVNF, Oliveira, RCBW, Koga-Ito, CY, Lyon, JP Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. *Mycopathologia* 2006;162:39-44.
- [8] Lacaz, CS, Porto, E, Martins, JEC, Heins-Vaccari, EM, Melo, NT *Tratado de Micologia Médica* Lacaz, São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.
- [9] Liébana, J *Microbiología Oral*. 1era. Edición. Edit. McGraw Hill Interamericana. México, DF. 1997.

- [10] Sidrin, JJC., Rocha, MFG. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos* Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 390p. 2004.
- [11] Emami E, Séguin J, Rompré PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *Int J Prosthodont.* 2007;20(5):514-20.
- [12] Odds FC, Bernaerts R CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32(8):1923-1929.
- [13] Beighton, D, Ludford, R, Clark, DT, Bailsford, SR, Pankhurst, CL, *et al.* Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J. Clin. Microbiol* 1995;33:3025.
- [14] Coelho CMP, Sousa YTCS, Daré MZ. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil.* 2004;31:135–139.
- [15] Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepek M, Zaremba M, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kedra BA, Anielska I, Górska M, Kedra BR Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci* 2006;51(1):77-80.
- [16] Freitas, JB, Gomez, RS, Abreu, MHNG, Ferreira E Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians *Journal of Oral Rehabilitation* 2008;35 (5):370–374.
- [17] Millar WJ, Locker D Edentulism and denture use. *Health Reports* 2005;17:55-8.
- [18] Steele JG, Walls AW, Ayatollahi SM, Murray JJ. Dental attitudes and behavior among a sample of dentate older adults from three English communities. *British Dental Journal* 1996;180:131-6.
- [19] Zissis A, Yannikakis S, Harrison A Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *International Journal of Prosthodontics* 2006;19:621-5.

- [20] Fanello, S, Bouchara, JP, Jousset, N, Delbos, V, Leflohic, AM Nosocomial *Candida albicans* acquisition in the geriatric unit: Epidemiology and evidence goes person-to-person transmission. *Journal of Hospital Infection* 2001;47:46–52.
- [21] Penha SS, Birman EG, Silveira FRX, Paula CR Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 2000;14:119–122.
- [22] Yokoyama, K, Biswas, SK, Miyaji, M, Nishimura, K Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *Candida* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:4503–4510.
- [23] Saballs, P, Toast-Rodríguez, JM, Salvadó, M La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia. Retrospectivo estudio de nueve casos. *Revista Iberoamericana de Micología* 2000;17:2–5.
- [24] Sandven, P Epidemiology of la candidemia. *R Iberoam Micol* 2000;17:73–81.

Table 1.

Inclusion and exclusion criteria

Inclusion criteria

Denture wearer

Patient from Center of Diagnosis of Mouth Diseases

Able to understand and respond to the questionnaire used in the study

Willing and able to accept the protocol and to give informed consent

Detection of diffuse or focal erythematous micropapular lesions, confined to palatal denture-bearing mucosa and clinically compatible with Chronica Atrophic Candidiasis

Lesions in dorsal tongue, central papillary atrophy, associated or not to a white surface change, besides the presence of the lesions at palte previously described

Exclusion criteria

Non-users of prostheses

Other oral conditions that preclude immediate mycological diagnosis

Acute or chronic symptoms of temporomandibular disorders

Patient without clinical manifestations compatible with those described in the inclusion criteria

Table 2. Sample distribution and prevalence of *Candida* isolates from patients with clinical diagnosis of denture stomatitis and *Candida* species according to the covariates

Variable	<i>Candida</i> isolates			<i>Candida</i> species		
	N	Prevalence (%)	P-value*	N	Prevalence (%)	P-value*
Appearance of the denture stomatitis			0.232			0.198
Red macules and areas of petechial hemorrhage	15	60.0		9	55.6	
Red macules and micropapules	63	49.2		31	38.7	
Diffuse erythema and red macules	11	81.8		9	44.4	
Diffuse erythema and micropapules	48	64.6		31	67.7	
Denture stomatitis and other clinical presentations of candidiasis that affect the oral mucosa	6	50.0		3	66.7	
Common sites of erythematous zone at palate			0.372			0.248
Central hard palate	17	41.2		7	71.4	
Anterior hard palate	59	57.6		34	55.9	
Posterior hard palate	6	50.0		3	0.0	
All palate-denture bearing mucosa, either junction of the hard and soft palate, or buccal mucosa	61	63.3		39	51.3	
Type of dental prostheses			0.484			0.869
Full dental prosthesis	77	55.8		43	55.8	
Removable partial prosthesis	57	63.2		36	50.0	
Both	9	44.4		4	50.0	
Time of denture use			0.392			0.821
Until 10 years	60	53.3		32	50.0	
More than 10 years	83	61.5		51	54.9	
Cleansing of dentures			1.000			0.218
No	3	66.7		2	0.0	
Yes	140	57.9		81	54.3	
Nocturnal denture wear			0.862			0.824
No	55	56.4		31	54.8	
Yes	88	59.1		52	51.9	
Diabetes mellitus			0.792			0.743
No	127	57.5		73	52.1	
Yes	16	62.5		10	60.0	
Smoking			0.540			0.124
No	113	56.6		64	57.8	

Variable	Candida isolates			Candida species		
	N	Prevalence (%)	P-value*	N	Prevalence (%)	P-value*
Yes	30	63.3		19	36.8	
Stomatitis			0.401			1.000
Palate	136	57.4		78	52.6	
“Kissing lesion” (palate + tongue)	6	83.3		5	60.0	
Total	143	58.0	-	83	53.0	-

* Fischer’s Exact Test.

Artigo 2

***In Vitro* Inhibitory Effects of Two *Mikania* (Asteraceae) Species on Bacterial Viability and Cell Adherence of Mutans Streptococci.**

In vitro antimicrobial activity of Mikania

Rafael Guerra Lund^{1,*}; Francisco A. B. Del Pino¹; Regiane Yatsuda²; Rosana Serpa³; Gladis Aver Ribeiro³; Pedro Luiz Rosalen²; Vera L. G Rehder²; Hyun Koo²

¹ *Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel) – Gonçalves Chaves Street, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas, RS, Brazil*

² *Department of Physiological Sciences, Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil*

³ *Department of Microbiology and Parasitology, Biology Institute, Federal University of Pelotas (UFPel)*

* Adress all correspondence to Rafael Lund, Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel)– Gonçalves Chaves Street, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel/Fax: +55 53 3222-6690; E-mail: rglund@ufpel.edu.br

Abstract

Natural products are noticeable sources of new antibiotics and their crescent valorization has the purpose to minimize the appearance of resistant microorganisms and the discovering of new drugs. This study evaluated the inhibitory effects of two species of *Mikania* on bacteria viability and cell adherence of mutans streptococci. Crude ethanol extracts (100% EtOH, v/v) obtained from dried leaves of *Mikania glomerata* Spreng (Mg) and *Mikania hirsutissima* DC. (Mh) were used in this research. The effects of these extracts against *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* 6715 were assessed by the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and inhibition of cell adherence to a glass surface (Adh). The concentrations from both plant extracts ranged between 2.5 µg/mL and 177.8 µg/mL. Ethanol was used as the negative control group. The MIC against *Streptococcus mutans* UA159 was 44.45 µg/mL (Mg) and 88.90 µg/mL (Mh), and the MBC was 88.90 µg/mL (Mh). Against *Streptococcus sobrinus* 6715, the MIC was 22.23 µg/mL (Mh) and 88.90 µg/mL (Mg), and the MBC was 177.80 µg/mL (Mh). The cellular adherence also was inhibited at concentrations of 20 µg/mL (Mh) and 40 µg/mL (Mg). These results provide promising baseline information for the potential use of two species of *Mikania* against mutans streptococci. These findings warrant more-in-depth studies of the active principles of these *Mikania* ethanol extracts.

Uniterms: cariostatic agents; dental plaque; *Streptococcus mutans*

Introduction

Nowadays is well-defined that dental caries is an transmissible infectious disease associated to a group of microorganisms. Although the human oral microbiot is quite diverse and complex, two species of mutans streptococci, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus*

sobrinus, have been implicated as the primary etiologic agents of dental caries. One of the most important virulence factors of these species is their ability to produce glucosyltransferases (GTFs) and synthesize water-insoluble glucans from sucrose, which allows bacteria to adhere firmly to the tooth surface and contribute to the formation of dental biofilm (Gibbons e Van Houte, 1975, Hamada e Slade, 1980; Marsh, 1992 and 1994; Svensäter et al., 2001; Napimoga et al., 2005). The acid production and acid tolerance of these species also serve as virulence factors, because the acid end products formed during the metabolism of dietary carbohydrates, such as sucrose, and the ability of bacteria to withstand acidification in dental plaque are essential for the development of dental caries. Therefore, a meaningful strategy for preventing dental caries would be to control both the growth and virulence factors, such as adherence, of *S. mutans* and *S. sobrinus*.

Medicinal plants have been used in traditional folk medicines for thousands of years, and have shown promising sources for discovery of novel potentially antibacterial, antifungal, antiviral, anticancer, and antihypertensive drugs. In the dental field, several studies have also shown the feasibility of using medicinal plants in the search of new alternatives for the control and treatment of oral infectious diseases, especially dental plaque-related diseases such as dental caries (Cai e Wu, 1996, Ikeno, Ikeno e Miyazawa, 1991, Israelson, 1991, Koo et al., 2000, 2002, Mosadomi, 1987, Osawa et al., 1992, Wu-Yan, Chen e Wu, 1988 and Yatsuda et al., 2005). In the last years the number of resistant microorganisms has increased while the number of new fármacos thrown at the market has decreased.

Among various medicinal plants used in Brazil, *Mikania* genus plant (Asteraceae family) a sub scrub creeper of woody branches, stands out because of its multiple pharmacological properties, especially anti-inflammatory, anti-allergic, analgesic and antimicrobial activities (Holetz et al., 2002; Yatsuda et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

The genus *Mikania* has about 430 species distributed in the tropical areas of Africa, Asia and America (King and Robinson, 1987). In Brazil, the genus is widely distributed, with about 200 described species (Barroso, 1986).

In this study, the studied species were *Mikania glomerata* Spreng., popularly known as “guaco” and *Mikania hirsutissima* DC, popularly known as “guaco cabeludo”, because they have been demonstrated antimicrobial properties in several studies (Holetz et al., 2002; Yatsuda et al., 2005). Some compounds have been identified and isolated from ethanol extracts of *Mikania* genus plants, such as dihydrocoumarin, coumarin, spathulenol, hecadenic acid, cupressenic acid, kaurenol, kaurenoic acid, isopropiloxi-grandifloric acid, isobutiloxi-grandoifloric acid, 2,5-ciclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis, hexadecanoic acid and 1-octadecene (Yatsuda et al., 2005).

Yatsuda et al. (2005) demonstrated that crude ethanol extracts, and ethyl acetate and hexane fractions from *M. laevigata* and *M. glomerata* showed antimicrobial activity on growth and cell adherence of mutans streptococci, in sub-MIC levels, suggesting these both *Mikania* species as sources for novel antimicrobial agents against oral pathogens. However, those extracts which showed highly antimicrobial activity from both *Mikania* species were the hexane fractions, indicating that the pharmacologically active components against the mutans streptococci had apolar characteristics (Yatsuda et al., 2005).

Considering that *Mikania* has promise bioactive compounds to caries disease control, the aim of this paper was to report the antimicrobial activity of ethanol extracts of two *Mikania* species (*Mikania glomerata* and *Mikania hirsutissima*) against mutans streptococci.

Materials and methods

Preparation of ethanol extracts

The plant species *Mikania glomerata* (Mg) and *Mikania hirsutissima* (Mh) were collected from the experimental field at the Multidisciplinary Center for Chemical, Biological and Agricultural Researches – CPQBA-UNICAMP, in Campinas, São Paulo, Brazil. Voucher specimens are deposited at CPQBA's Herbarium. The plants were harvested, washed and dried under air circulation at 40°C for 72 h and ground for uses.

M. glomerata ethanol extract

Forty-five grams of the resulting dried powder of *M. glomerata* were submitted to dynamic maceration (Polytron extraction) with 500mL EtOH for 3 min. The extract was filtered and this procedure was repeated three times. After that, the residuous' extract was washed with 50 mL EtOH. Then, the residuous' extract was once again submitted to re-extraction with 200 mL EtOH for 3 min and filtered. Then, the residuous' extract was again washed with 75 mL EtOH and the supernatants were joined. Then, the total supernatant was concentrated under reduced pressure in rotavapor until drying. The yield of *M. glomerata* ethanol extraction was 20% (w/w).

M. hirsutissima ethanol extract

17.6 g of dried powder of *M. hirsutissima* were submitted to maceration (Polytron extraction) with 350 mL EtOH for 3 min. This procedure was repeated three times. After that, the residuous' extract was washed with 30 mL EtOH. Then, the residuous' extract was once again submitted to re-extraction with 100 mL EtOH for 3 min and filtered. Then, the residuous' extract was again washed with 40 mL EtOH and the supernatants were joined. Then, the total supernatant was concentrated under reduced pressure in rotavapor until drying. The yield of *M. hirsutissima* ethanol extraction was 18.75% (w/w).

Both ethanol extracts from the *Mikania* species were dissolved in 70% ethanol (v/v) just prior the performance of the assays.

Strains

The microorganisms used in this study were *Streptococcus mutans* UA159 and *Streptococcus sobrinus* 6715. These Gram-positive bacteria were obtained from the Department of Pharmacology, Anesthesiology and Therapeutics, Faculty of Dentistry, University of Campinas (UNICAMP) (Piracicaba, São Paulo, Brazil).

Antimicrobial activity assays

Broth dilution assay (MIC and MBC)

The antimicrobial activity of the ethanol extracts of *M. glomerata* and *M. hirsutissima* were examined by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) in accordance to Koo et al. (2000b) and Duarte et al. (2003). For MIC determination, the starting inoculum was 5×10^5 CFU mL⁻¹. Two-fold dilution series of extracts (concentrations ranging from 11.11 to 177.8 µg mL⁻¹ two-folds) were tested. The vehicle ethanol (70% v/v) was used as control. MIC was defined as the lowest concentration of the extract that had restricted the growth to a level lower than OD of 0.05 at 660nm (no visible growth). For the determination of MBC, an aliquot (50µL) of all incubated test tubes, with concentrations higher than the MIC, was sub-cultured on Agar Columbia plates supplemented with 5% of defibrinated sheep blood. The MBC was defined as the lowest concentration that enables no growth on the blood agar (99.9% killed). Three replicates were made for each concentration of the tested extracts for both assays (MIC and MBC), in each experiment. The experiment was repeated three times.

Inhibition of growing cell adherence to glass surface

To assess the bacterial adherence to a glass surface, microorganisms were grown in BHI broth plus 1% sucrose (w/v) at 37°C, 10% CO₂ at an angle of 30° for 18h in glass test-tubes, containing sub-MIC levels of the *M. glomerata* and *M. hirsutissima* ethanol extracts (or vehicle control) as detailed in Hamada and Torii (1978) and Koo et al. (2000a). Isolated colonies, after cultured in brain-heart infusion agar plates, during 18-24 h, were suspended in 4.5mL of sterile brain-heart infusion broth, and the suspension adjusted to 0.5 on the McFarland scale ($1.5 \cdot 10^8$ CFU \cdot mL⁻¹). A portion of the suspension was mixed with brain-heart infusion broth (1:1000 dilution, v/v) containing 1% sucrose, and 2.48 mL were transferred to a test-tube. Subsequently, 20μL of a two-fold dilution series of the test extracts (*M. glomerata* and *M. hirsutissima*) (concentrations ranging from 2.5 to 160 μg mL⁻¹ reaction) and their control (70% ethanol, v/v) were inoculated, stirred and then incubated. After incubation, the adhered cells were washed and re-suspended in an ultrasonic bath. The amount of adhered cells was measured spectrophotometrically at 550 nm (Hamada & Torii, 1978; Duarte et al., 2003).

The inhibition of adherence was defined as the lowest concentration that allowed no visible cell adherence on the glass surface. Three replicates were made for each concentration of the tested extracts in each experiment. The experiment was repeated three times.

Results and Discussion

In this investigation, ethanol extracts from *Mikania glomerata* and *Mikania hirsutissima* showed inhibition of the growth and cell adherence of mutans streptococci.

The MIC and MBC values are shown in Table 1. The ethanol extracts tested from both *Mikania* species inhibited the growth of the bacterial strains *Streptococcus mutans* UA159

and *Streptococcus sobrinus* 6715. However, the ethanol extract of *Mikania glomerata* did not show bactericidal activity against *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* 6715.

The ethanol extract of *Mikania hirsutissima* showed higher bacteriostatic activity than ethanol extract of *Mikania glomerata* displaying the lowest MIC against *S. mutans* (44.45 μ g/mL) and *S. sobrinus* (22.23 μ g/mL), but the bactericidal effect was similar against the oral pathogens (MBC=88.90 μ g/mL against *S. mutans* and MBC=44.45 against *S. sobrinus*).

Furthermore, this study investigated if the ethanol extracts of *M. glomerata* and *M. hirsutissima* would affect the sucrose-dependent adherence of the growing cells of mutans streptococci to a glass surface. Both ethanol extracts from *Mikania* genus were able to inhibit the adherence of mutans streptococci cells to a glass surface, but, again, the most effective ethanol extract was from *Mikania hirsutissima* with a total inhibition of adherence against *S. mutans* and *S. sobrinus* at a concentration of 20 μ g/mL). This microbiological assay is an interesting aspect of the study because it is suggested to investigate mutans streptococci's virulence factors, mainly those involved in adhesion, as target for antimicrobials. The search of new targets has been one of the challenges in the development of these drugs (Yatsuda et al., 2005).

The results of the present study provide an important basis for the use of ethanolic extracts from *Mikania* species for the treatment of infections associated to oral microorganisms, such as mutans streptococci. Studies must be carried out for isolation and identification of those compounds responsible for the antimicrobial effects and inhibition of cell adherence. These studies are necessary for the discovery of novel natural products with lower adverse effects than the industrialized ones.

References

- Barroso, GM (1986) Sistemática de angiospermas do Brasil. Imprensa universitária. Universidade federal de Viçosa Vol. 3. *Apud* Ruas, PM, Ruas CF, Maffei, EMD, Marin-Morales, MA, Aguiar-Perecim, MLR (2000) Chromosome studies in the genus *Mikania* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 23, pp. 979–984.
- Cai, L, Wu, CD (1996) Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod* 59:987-990.
- Duarte, S, Koo, H, Bowen, WH, Hayacibara, MF, Cury, JA, Ikegaki, M, Rosalen, PL (2003). Effect of a novel type *os propolis* and its chemical fraction on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26:527–531.
- Gibbons, RJ, Van Houte, J (1975) Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann Rev Microbio*, 29:19-44.
- Hamada, S, Slade, HD (1980). Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J Dent Res* 63:407-411.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:1027-1031.
- Ikeno, K, Ikeno, T, Miyazawa, C, (1991) Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 25:347-351.
- Israelson, L (1991). The role of natural products in oral health care. *J Clin Dent* (Spec. Iss):5-6.
- King, RM, Robinson H (1987) The genera of Eupatoriae (Asteraceae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, Vol. 9, p. 581.

Koo, H, Rosalen, PL, Cury, JA, Ambrosano, GM, Murata, RM, Yatsuda, R, Ikegaki, M, Alencar, SM, Park, YK (2000) Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on Mutans Streptococci. *Curr Microbiol* 41:192-196.

Koo, H, Pearson, SK, Scott-Anne, K, Abranches, J, Cury, JA, Rosalen, PL, Park, YK, Marquis, RE, Bowen, WH (2002) Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol* 17(6):337-343.

Marsh, PD (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8:263-271.

Marsh, PD, Martin, M (1992) Oral microbiology, 3rd ed. Chaoman & Hall, Ltd, London, United Kingdom.

Mosadomi, HA (1987) The effect of crude extracts of nine African chewing sticks on oral anaerobes. *J Med Microbiol* 23:55-60.

Napimoga, MH, Hofling, JF, Klein, MI, Kamiya, RU, Gonçalves, RB (2005) Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Science* 47(2):59-64.

Oliveira F, Pereira AC, Figueiredo HC, Carvalho DA, Silva G, Nunes AS, Alves DS, Carvalho HW (2007) Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region, *Fitoterapia* 78:142–145.

Osawa, K, Yasuda, H, Maruyama, T, Morita, H, Takeya, K, Itokawa, H (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull* 40:2970-2974.

Svensäter, G, Welin, J, Wilkins, JC; Beighton, D, Hamilton, IR (2001) Proteins expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters* 205:139-146.

Wu-Yuan, CD, Chen, CY, Wu, RT (1988) Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans streptococci. *J Dent Res* 67:51-55.

Yatsuda, R, Rosalen, PL, Cury, JA, Murata, R M, Rehder, VL, Melo, LV, Koo, H (2005) Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J Ethnopharmacology* 97(2):183-189.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values (n=9) of ethanol extracts of *M. glomerata* and *M. hirsutissima* against *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* 6715

	<i>Mikania glomerata</i>		<i>Mikania hirsutissima</i>	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>S. mutans</i> UA159	88.90	88.90	44.45	88.90
<i>S. sobrinus</i> 6715	44.45	44.45	22.23	44.45

Total inhibition of bacterial cell adherence

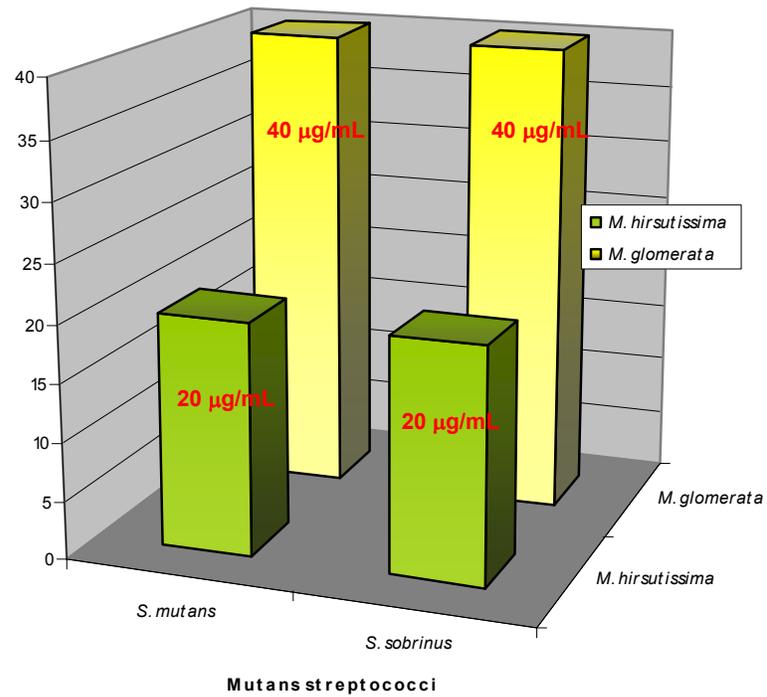


Figure 1. The minimum concentration of *M. glomerata* and *M. hirsutissima* ethanol extracts capable of inhibiting the adherence of growing *S. mutans*UA159 and *S. sobrinus* 6715 cells.

7 Conclusões

CONCLUSÕES ARTIGO 1

Os resultados do Artigo 1 sugerem que:

1) Não há uma diferença significativa entre pacientes com diagnóstico clínico de estomatite por dentadura com relação à ausência ou presença de leveduras do tipo *Candida*;

2) Não houve relação entre a ocorrência de levedura *Candida* em pacientes com manifestação clínica de Candidíase Atrófica Crônica (CAC) e importantes fatores relacionados à esta infecção oportunista;

3) Os ensaios microbiológicos do presente estudo não indicam que as variáveis investigadas apresentam um efeito significativo na infecção oral por *Candida* ou outras espécies do gênero;

4) Com a coleta das amostras microbiológicas dos pacientes, foi possível isolar e identificar espécies de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* que acometem a cavidade bucal de indivíduos com Candidíase Atrófica Crônica (CAC).

CONCLUSÕES ARTIGO 2

Os resultados do presente estudo oferecem base importante para o uso de extratos etanólicos de *Mikania glomerata* e *Mikania hirsutissima* para o tratamento de infecções associadas a microrganismos orais, como os estreptococos do grupo mutans. Os efeitos inibitórios marcantes dos extratos etanólicos destas espécies de *Mikania* podem ser uma fonte útil para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra patógenos orais, como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Contudo, outros estudos farmacológicos e de toxicidade deverão ser realizados para confirmar esta hipótese. Os resultados deste estudo também sugerem o isolamento e identificação dos princípios ativos dos extratos etanólicos de *Mikania*.

Referencias Bibliográficas

ALDRED, M. J.; ARENDORF, T. M.; WADE, W. G.; TSCHOEPE, G. A.; BROWNLOW, N. P. Frequency and density of yeasts in the mouths of malnourished children. **Community Dent Oral Epidemiol** v.17, p.136-8, 1989.

ALIGIANNIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S., CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem** v.49, p.4168-70, 2001

AKPAN, A., MORGAN, R. Oral Candidiasis. **Postgrad Med Journal** v.78, p.455-459, 2002.

BARBIERI, D.S.V., VICENTE, V.A., FRAIZ, F.C., LAVORANTI, O.J., SVIDZINSKI, T.E., PINHEIRO, R.L. analysis of the *in vitro* adherence of *streptococcus mutans* and *Candida albicans* **Brazilian Journal of Microbiology** v.38, p.624-631, 2007.

BARBIZAN, L. F., MIYAMOTO, M., SCOLASTICI, C., SALVADORRI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., EIRA, A. F., CAMARGO, J. L. V. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 25-32, 2002.

BARTHOLOMEW, G. A., RODU, B., BELL, D. S. Oral candidiasis in patients with diabetes mellitus: a thorough analysis. **Diabetes Care** v.10, p.607-12, 1987.

BEIGHTON, D., LUDFORD, R., CLARK, D.T., BAILSFORD, S.R., PANKHURST, C.L., et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.3025, 1995.

BEIRA, F. T. A. Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de la planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn., Universidad de Barcelona, Barcelona, 2000.

BERDISCEVSKI, H., BEM-ARYEH, H., SZARGEL, R. Oral *Candida* in assintomaptic denture wearers. **Int. J. Oral Surg.** v.9, n.12, p.112-115, 1980.

BOMBARDELLI, E., BOMBARDELLI, V. Twenty years' experience in the botanic health food market. **Fitoterapia**, v. 76, p. 495-507, 2005.

BURNETT, G. W. **Microbiologia oral & doenças infecciosas** 4/Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978.

BRASIL (1996). Lei 9279, de 14 de maio de 1996 – Lei de Patente.

BRASIL. Resolução RDC – nº 48, de 18 de março de 2004 (DOU 18/03/2004). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. ANVISA, Brasília, 2004.

CAI, L., WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal Natural Products**, v.59, p.987-990, 1996.

CALDERONE, R. A., FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol** v.9, p.327-35, 2001.

CASTRO, V., JAKUPOVICC, J., BOHLMANN, F. Sesquiterpene lactones from *Mikania* species. **Phytochemistry**, v.25, n.7, p.1750-1752, 1986.

CECANHO, R., KOO, H., ROSALEN, P. L., PIEROBON, C. N., PARK, Y. K., REHDER, V. L. G., FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L.,. Atividades antimicrobianas

de extratos de plantas medicinais sobre patógenos bucais. XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - 1998 - Águas de Lindóia-SP.

CECANHO, R., KOO, H., ROSALEN, P. L., PARK, Y. K., CURY, J.A. Efeito do extrato hidroetanólico de *Mikania laevigata* sobre o crescimento bacteriano e a produção de glucanos por estreptococos do grupo *mutans*. Anais da XIV Reunião Anual da FESBE (Federação da Sociedade de Biologia Experimental), v.14, p.290 (resumo #12.095), 25/28 /agosto/ 1999. Caxambu, 1999.

CHALLACOMBE, S. J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** v.78, p.202-10, 1994.

CHIMENOS, E., PUY, D., AND LOPEZ, J. Antifungal drugs in the management of mycosis. **Med Oral** v.3, p.78-90, 1998.

COELHO CMP, SOUSA YTCS, DARÉ MZ. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J Oral Rehabil** v.31, p.135–139, 2004.

COLEMAN, D.C. *et al*, Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: New perspectives/ New approaches. **Critical Reviews in Microbiology** v.19, n.2. p.61-82, 1993.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3v. 1972.

CRUZ, G.L., **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Bertrand: Rio de Janeiro, 1995.

CRUZ, J. P. G., LIBERALLI, C. H. R. Contribuição ao Estudo Químico de *Mikania hirsutissima* DC. **Rev Flora Med**, v.4, n.7, p.395-433, 1938.

DANILUK, T., TOKAJUK, G., STOKOWSKA, W., FIEDORUK, K., SCIEPUK, M., ZAREMBA, M.L., ROZKIEWICZ, D., CYLWIK-ROKICKA, D., KEDRA, B.A., ANIELSKA, I., GÓRSKA, M., KEDRA, B.R. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. **Adv Med Sci** v.51 Suppl 1, p.77-80, 2006.

DENADAI, R., LIMA, P. L. A., SALVADORI, D. M. F., EIRA, A. F., BAZO, A. P., RIBEIRO, L. R. The protective effect of mushroom (*Agaricus blazei*) teas on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.3, p.179, 1998.

DUARTE, M. C., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A., REHDER, V. L., DELARMELENA, C. Anti-*candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005

EMAMI, E., SÉGUIN, J., ROMPRÉ, P.H., DE KONINCK, L., DE GRANDMONT, P., BARBEAU, J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. **Int J Prosthodont**. v.20, n.5, p.514-20, 2007.

FAN, L., SOCCOL, A. T., PANDEY, A., GERMANO, S., RAU, R., PEDROSO, A. L., SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* s. Wasser et al. LPB 03 (*Agaricomycetidaeae*) in submerged fermentation and its antitumor effect. **International Journal of Medicinal Mushroom**, v.5, p.17-23, 2003.

FANELLO, S., BOUCHARA, J. P., JOUSSET, N., DELBOS, V., LEFLOHIC, A. M. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in the geriatric unit: Epidemiology and evidence goes person-to-person transmission. **Journal of Hospital Infection**, v.47, p.46–52, 2001.

FREITAS, J. B., GOMEZ, R. S., ABREU, M. H. N. G., FERREIRA E., FERREIRA Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians **Journal of Oral Rehabilitation** v.35, n.5, p.370–374, 2008.

FUJIMOTO, Y., Extration of anticancer cyclic compound from *Mikania hirsutissima* stems or leaves. Apud: **Chem Abstr**, v.124, n. P37682d. 1995.

GIBBONS, R. J., VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, v.29, p.19-44, 1975.

GU, Y.H., BELURY, M. A. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. **Cancer Letters**, v.220, p.21-28, 2005.

HAMADA, S., SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v.63, p.407-411, 1980.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium growth in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 71-74, 2001.

HIRASAWA, M., SHOUJI, N., NETA, T., FUKUSHIMA, K., TAKADA, K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.11, p.151-157, 1999.

IKENO, K., IKENO, T., MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 25, p. 347-351, 1991.

ISRAELSON, L. The role of natural products in oral health care. **Journal of Clinical Dentistry**, (Spec. Iss), p.5-6, 1991.

KAWAGISHI, H., INAGAKI, R., KANAO, T., MIZUNO, T., SHIMURA, K., ITO, H., HAGIWARA, T., NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1→6) β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrate Research**, v.12, p.393-403, 1990.

KENNEDY, M. J., JOHNSON, A. M., VOLZ, P. A., NEELY, A. N., AND YANCEY, R. J. Virulence and adhesive properties of serotypes A and B of *Candida albicans* isolated from paediatric burn patients. **J Med Microbiol** v.36, p.428-36, 1992.

KUMAR, A., SAMARTH, R. M., YASMEEN, S., SHARMA, A., SUGAHARA, T., TERADO, T., KIMURA, H. Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. **Biofactors**, v.22, n.1-4, p.87-91, 2004.

KUROIWA, Y., NISHIKAWA, A., IMAZAWA, T., KANKI, K., KITAMURA, Y., UMEMURA, T., HIROSE, M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.1047-1053, 2005.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.

LEHNER, T. Classification and clinico-pathological factors features of *Candida* infections in the mouth. In.: **Simposium on Candida infection**. Eds. HI. Winner and R. Hurley. Churchill Livingstone. London. 1967.

- LEWIS, H., ELVIN-LEWIS, M. P. F. In.: **Medical Botany**. New York, Wiley & Sons, 1977.
- LIÉBANA, J. **Microbiología Oral**. 1era. Edición. Edit. McGraw Hill Interamericana. México, DF. 1997.
- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR, V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MARCOTE, H., LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.71-109, 1998.
- MARSH, P. D. & MARTIN, M. Oral microbiology, 3rd ed. Chaoman & Hall, Ltd, London, United Kingdom, 1992.
- MARSH, P.D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **Journal of Dental Research**, v. 71, p. 1431-1438, 1992.
- MENOLI, R. C. R. N., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, L. R., SPEIT, G., JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of of the mushroom *Agaricus blazei*_Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v.496, p.5-13, 2001.
- MILLAR W.J., LOCKER D. Edentulism and denture use. **Health Reports** v.17, p.55-8, 2005.
- MOSADOMI, H.A. The effect of crude extracts of nine African chewing sticks on oral anaerobes. **Journal of Medical Microbiology**, v.23, p.55-60, 1987.
- NAPIMOGA, M. H., HOFLING, J. F., KLEIN, M. I., KAMIYA, R. U., GONÇALVES, R. B. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **Journal of Oral Science**, v.47, p.59-64, 2005.
- NCCLS/CLSI. Método de Referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma aprovada – 2a edição. (ANVISA, ed.), Vol. 22, n. 15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasil, 2005.
- NEVILLE B.W., DAMM D.D., ALLEN C.M., BOUQUOT J.E. **Oral & maxillofacial pathology**. 2nd edn. Philadelphia: Saunders Company; 2001.
- NEWTON, A. V. Denture sore mouth a posible etiology. **British Dental Journal**, v. 112, p.357, 1962.
- ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. 2nd Ed. Buttler and Tanner Ltd, London. 1988.
- ODDS F.C., BERNAERTS R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.8, p.1923-1929, 1994.
- OHKOSHI, E., MAKINO, M., FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituentes of *Mikania hirsutissima* (Compositae). Chem Pharm Bull v.47, n.10, p.1436-1438, 1999.
- OHMAN, S.C., OSTERBERG, T., DAHLEN, G. The prevalence the *Staphylococcus aureus*, *Enterobactereaceae* species and *Candida* species and their relationship to oral mucosal lesion in a grtoup of 79-years-old in Goteborg. **Acta Odontol. Scand.** v.53, n.1, p.49-54, 1995.

- OSAWA, K., YASUDA, H., MARUYAMA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.40, p.2970-2974, 1992.
- PACCOLA, E. A. S., MAKI, C. S., NOBREGA, G. M. A., PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.176-178, 2001.
- PAULA, C. R. Candidíases. In.: Compendio de Micologia Médica (C. C. ZAITZ, I.; MARQUES, A. S., ed.), pp. 99-107. Medsi, Rio de Janeiro, 1998.
- PENHA, S.S., BIRMAN, E.G., SILVEIRA, F.R.X., PAULA, C.R. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, p. 119–122, 2000.
- PEREIRA, N. A., PEREIRA, B. M. R., NASCIMENTO, M. C., PARENTE, J. P., MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antifotes, IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v.60, p.99-100, 1994.
- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol** v.42, p.4419-31, 2004.
- PFALLER, M. A., RHINE-CHALBERG, J., REDDING, S. W., SMITH, J., FARINACCI, G., FOTHERGILL, A. W., AND RINALDI, M. G. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. **J Clin Microbiol** v.32, p.59-64, 1994.
- PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.27, p.1-50, 1991
- PIDDOCK, L. J. V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p.307-318, 1990.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Vol. 3, pp. 517-520. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1942.
- PIRES, M. F. C., CORRÊA, B., GAMBALE, W., PAULA, C. R. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. **Brazilian Journal of Microbiology** v.32, p.163-169, 2001.
- QUIROGA, E. N., SAMPIETRO, A. R., VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** v.74, p.89-96, 2001.
- RESENDE, M. A., SOUSA, L. V. N. F., OLIVEIRA, R. C. B. W., KOGA-ITO, C. Y., LYON, J. P. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. **Mycopathologia**, v.162, p.39-44, 2006.
- RESNIK, D. A. Perspectives – Oral manifestations of HIV disease. **Topics in HIV Medicine**, v.13, n.5, p.143-148, 2005.
- REHDER, V. L. G., RODRIGUES, M. N. N., MELLO, L. V., SANTOS, A. S., Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de diterpenos

presentes em *Mikania* por LC-DAD. **XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais**, 2002 na cidade de Cuiabá/MT.

RODRIGUES, R.F.O. Estudo farmacognóstico comparativo de duas espécies conhecidas como cipó-almécega-cabeludo – *Mikania hirsutissima* DC e *Mikania malacolepsis* ROBINSON [tese]. São Paulo: USP/FCF, 1998.

SABALLS, P., TOAST-RODRÍGUES, J. M., SALVADÓ, M. La candidemia en el syndrome of acquired inmunode.ciencia. Retrospective estudio de nueve casos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p.2–5, 2000

SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand** v.48, p.27, 1990.

SANDVEN, P. Epidemiology of la candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p.73–81, 2000.

SANTOS, E.B., SCHWARTZ FILHO, H., SCHWARTZ, E.A., RAMOS JR., E. Perfil da Saúde bucal e presença de Candidana cavidade bucal de pacientes atendidos nas Clínicas Odontológicas da UEPG. **Biological and Health Sciences** v.8, n.1, p.57-73, 2002.

SCULLY, C., EL-KABIR, M., SAMARANAYAKE, L. P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.5, p.125-157, 1994.

SCHUHMACHER, A., REICHLING, J., SCHNITZLER, P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. **Phytomedicine**, v.10, n.6-7, p.504-510, 2003.

SIDRIN, J. J. C., ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos** Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 390p. 2004.

STEELE, J.G., WALLS, A.W., AYATOLLAHI, S.M., MURRAY, J.J. Dental attitudes and behavior among a sample of dentate older adults from three English communities. **British Dental Journal**, v.180, p.131-6, 1996.

SUDBO, J., REITH, A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. **International Journal of Cancer**, v.115, p.339-345, 2005.

TAKUSABURO, E., YOSHIKI, F. Antitumor effect of peptideglucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)**, v.11, p.249–265, 1998.

TEN CATE, J. M., MARSH, P. D. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. **J Dent Res** v.73, p.695-703, 1994.

TORTORANO, A. M., PRIGITANO, A., BIRAGHI, E., VIVIANI, M. A. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: in vitro susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. **J Antimicrob Chemother** v.56, p.777-779, 2005.

TSUCHIYA T. Serological characterization. **Methods Microbiol** v.16, p.26, 1980.

VALGAS, C., SOUZA, S.M., SMÂNIA, E.F.A., SMÂNIA JR., A. screening methods to determine antibacterial activity of natural products **Brazilian Journal of Microbiology** v.38, p.369-380, 2007.

- VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- WANG, S. M., YANG, Y. J., CHEN, J. S., LIN, H. C., CHI, C. Y., AND LIU, C. C. (). Invasive fungal infections in pediatric patients with leukemia: emphasis on pulmonary and dermatological manifestations. **Acta Paediatr Taiwan** v.46, p.149-155, 2005.
- WEBB, B.C., THOMAS, C.J., WILLCOX, M.D.P, HARTY, D.W., KNOX, K.W. *Candida* associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Australian Dental Journal**. v.43, p.45-50,1998
- WILSON, J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. **British Dental Journal**, v.185, p.380-384, 1998.
- WU-YUAN, C.D., CHEN, C.Y., WU, R.T. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis and aggregation of mutans streptococci. **Journal of Dental Research**, v. 67, p. 51-55, 1988.
- WU-YUAN, C.D., GREEN, L., BIRCH, W.X. *In vitro* screening of chinese medicinal toothpastes: Their effects on growth and plaque formation of mutans streptococci. **Caries Research**, v. 24, p.198-202, 1990.
- YAGIELA, J. A., DOWD, F. J., NEIDLE, E. A. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry, 5th edition, Ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri. 2004.
- YATSUDA, R., ROSALEN, P. L., CURY, J. A., MURATA, R. M., REHDER, V. L. G., Effect of *Mikania* genus plant on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.183-189, 2005.
- YOKOYAMA, K., BISWAS, S. K., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *Candida* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4503–4510, 2000.
- ZAOUTIS, T. E., ARGON, J., CHU, J., BERLIN, J. A., WALSH, T. J., AND FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin Infect Dis** v.41, p.1232-9, 2005.
- ZISSIS, A., YANNIKAKIS, S., HARRISON, A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. **International Journal of Prosthodontics**, v.19, p.621-625, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 - Normas para submissão do Artigo 1

Lund, R.G.; Del Pino, F. A. B.; Nascente, P. S.; Ribeiro, G. A; Freitag, R. A.; Rosalen, P.L. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* sp. in patients with clinical manifestations of Chronic Atrophic Candidiasis and prevalence of variables associated to this opportunistic infection. *Acta Odontologica Scandinavica*;

ANEXO 2 - Normas para submissão do Artigo 2

Lund, R. G.; Del Pino, F. A. B.; Yatsuda, R.; Serpa, R.; Ribeiro, G. A.; Rosalen, P. L.; Rehder, V. L. G.; Koo, H. *In Vitro* Inhibitory Effects of Two *Mikania* (Asteraceae) Species on Bacterial Viability and Cell Adherence of Mutans Streptococci. *Pharmaceutical Biology*.

ANEXO 3 - Questionário de entrevista aos pacientes atendidos no Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca.

ANEXO 4 - Aprovação do projeto no Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia - UFPel.

ANEXO 5 - Apresentações clínicas das lesões eritematosas de CAC.

ANEXO 6 - Procedimentos de colheita das amostras microbiológicas.

ANEXO 7 - Protocolo de testes para identificação de espécies do gênero *Candida*.

ANEXO 8 - Plano geral do trabalho de tese.

ANEXO 1

Normas para submissão do Artigo 1

Instructions for Authors

Scope of the Journal

The scope of the journal covers all aspects of dentistry, both basic and clinical science. In general, analytical studies are preferred to descriptive studies. Articles reporting novel research showing cause and effect relationships for experimental studies and explanatory / associative relationships for those of an observational nature are favored. Hypothesis driven research are encouraged since simple descriptive reports tend to have relatively low scientific priority for publication.

Original research papers, review articles, short communications, and letters to the Editor will be considered for publication. Review articles may be invited by the Editor-in-Chief, but will be subjected to peer review. Proposals for review articles should be discussed with the Editor prior to submission. Short communications should not be longer than two printed pages, and should contain new and important information. Short communications should follow the usual division into Material and methods etc. and have a short abstract.

For more information on most aspects of scientific writing, consult *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, published by the International Committee of Medical Journal Editors and freely available at: www.icmje.org.

Manuscript submission

All submissions should be made in final, fully corrected form online at *Acta Odontologica Scandinavica's Manuscript Central site*. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site submissions should be made via the Corresponding Author Centre.

Receipt of the manuscript in the editor's office will be acknowledged via email. The manuscript will then be distributed to two or more external peer reviewers allotted a time period of four weeks for the review. The reviewers will be anonymous, but the authors' names will be known to the reviewers. If reviewers' opinions conflict, the manuscript may be sent to an extra reviewer. Efforts are made to avoid all types of conflict of interest when the reviewers are selected. The authors must always suggest two reviewers, and also have the option to name unsuitable reviewers.

Cover letter

It must be stated in the cover letter, that the manuscript has not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere, and that all authors have read and approved the manuscript. If there is more than one author, the contribution of each author should be stated. Gift authorship is not acceptable. State any conflict of interest related to individual authors' commitments and any project support. Give reference (registration number or the like) to research ethical permission, if applicable, as locally regulated for research on humans or animals.

Make a full statement about all submissions and previous reports that could be regarded as redundant or as duplicate publication of the same or similar work, and alert the editor if the manuscript includes subjects about which the authors have published a previous report or have submitted a related report to another journal. Refer to and reference any such report in the new paper. Upload copies of such material as supplementary files.

Authors are responsible for obtaining permission from everyone acknowledged by name in Acknowledgment section, because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Therefore, state explicitly that acknowledged persons have seen the text and given their permission to be named.

Manuscript preparation

Editors and reviewers spend many hours reading manuscripts, and therefore they appreciate receiving material that has been carefully prepared in accordance with these Instructions to Authors.

Authors are advised to consult a recent issue of the Journal to be familiar with its style and format. The whole manuscript should be submitted in correct English. Authors whose native language is not English are strongly recommended to obtain assistance from someone proficient in scientific English. Manuscripts not submitted in the proper format or in poor English may be returned without review.

The parts of a manuscript should be as follows: Title page, abstract page, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends, tables, and figures, arranged in that order. This division is also appropriate for short communications. For review papers and qualitative studies, other headings may be used as appropriate. Use the built-in system of headings of your word processor to divide up and clarify the text; however, use not more than three levels of division. All text files (including abstract, keywords and figure legends) should be uploaded onto Manuscript central as one MS Word file and in the format described below.

To facilitate the editing of your manuscript, and lessen the time to publication, please adhere to the following simple general guidelines and advices:

1. Use double spacing throughout and left and margin of at least 3 and 5 cm, respectively leaving space for the reviewer to add notes.
2. Begin each of the following sections on a separate sheet: title page; abstract and key words; body of the text starting with introduction; acknowledgements; references; figure legends and tables (each on a separate sheet).
3. Use font Times New Roman 12 point. If you use a non-English word processor, program it for English. Be especially careful to use full stop as decimal point, not comma. As spell checker, use American English. Check that diacritic signs are found in names only.
4. Number the pages consecutively beginning with the title page. Do not number lines.
5. Use the left alignment feature for a paragraph.
6. Avoid end-of-line hyphens.
7. The beginning of paragraphs should be properly marked with an indent.
8. Use a single hyphen to hyphenate compound words and a double hyphen (–) to indicate a dash in the text.
9. Enter only one space after the full stop at the end of a sentence.
10. Be consistent: use the same form of units, etc., and key these elements in exactly the same way throughout the manuscript. Prut a space between the digits and the unit, e.g. 5.2 mm.
11. When emphasizing words (seldom necessary), use the italics feature of your word processor software rather than the underline feature.
12. Do not use the lowercase l for 1 (one) or the uppercase O for 0 (zero), use the proper numerals instead.
13. Use the space bar only as a word separator, not as a tabulator.
14. Format tables using the table functions of your word processor.

Title page

The title page has to contain the following information:

1. A concise but fully informative title (a subtitle may be used in addition, but must be short). Avoid unnecessary words such as “Study on”, “An investigation of” etc, and also affirmative wordings. The title should include species used (if appropriate) and any non-standard acronyms or abbreviations should be avoided. Include all information in the title necessary to make electronic retrieval of the article both sensitive and specific. Do not capitalize the title: only the first word and proper nouns have capital initials.

2. The full name of each author. Use capital letters. Do not include academic degrees.
3. The departments and institutions to which the work should be attributed, including the city and country, for each author. Using numbering in superscript, key each author to the relevant institution.
4. A short title not exceeding 40 letters and spaces for use as a running head.
5. Give the name and current address of the author to whom correspondence, proofs, and reprints are to be sent. Include telephone and telefax numbers as well as e-mail address. Observe that these data will be published with the paper.
6. The number of figures and tables.

Abstract and key words

Present the abstract limited to 250 words on a separate page. The abstract should briefly state the objective of the investigation, basic procedures, main findings, and principal conclusions. Use only standard abbreviations, and include no references. Structure the abstract using the headings *Objective*, *Material and methods*, *Results*, and *Conclusions* in one paragraph.

Give not more than five key words in alphabetical order after the abstract, and, wherever possible, use terms from the Medical Subject Headings list of *Index Medicus*. Do not repeat words from the article title.

Abstract and keywords should be included in the main document file.

Introduction

Provide a context or background for the study (i.e. the nature of the problem and its significance). Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. In the last paragraph of the section, state the aim of the study concisely, and, where applicable, give the research hypothesis (but not the null hypothesis). *When drawing comparisons for experimental or interventional studies, the latter must always be expressed explicitly.*

Material and methods

In this section, describe all methods, materials and subjects so that researchers can readily repeat the study. Use appropriate subheadings for the different sections to obtain clarity. Define the material and equipment used in as detailed manner as necessary by, for example, name, product number and batch, and identify the manufacturer by product, city, and country in parentheses. *For common methods, a brief description and a reference may be enough; however, if you deviate from the common method, give a full description.* Quantitative estimates of the validity and reliability of the methods are desirable. Report length, height, weight, and volume in metric units (meters, kilograms, or liters), or their decimal multiples. Give temperatures in degrees Celsius and use of the International System of Units (SI) is recommended. Correct unit abbreviations should be used (e.g. "yr", "wk", "d", "h", "min", "s" and "µm"). For many details the Biochemical Journal web site <http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm#NOMENCLATURE> can be a valuable resource. Scientific names of bacteria, binomials in italics, must be given in full when first mentioned. Subsequent mention may abbreviate genus, taking care that this abbreviation is unambiguous (Staph. or Strep. instead of S.).

Describe subjects participating in the study in detail so that a similar group of subjects can be identified readily. Include eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. If applicable, describe ethical aspects here. Indicate that informed consent has been obtained. However, submit such details as the diary number in the covering letter.

When submitting review manuscripts, particularly Systematic Reviews, include a section describing the methods used in locating, selecting, extracting, and synthesizing data. Summarize these methods in the abstract.

Statistics

Conclude the Material and methods section with a paragraph dealing with statistics, if applicable. Name and specify all non-descriptive statistical methods if applicable. The praxis of *naming statistical terms and methods is very variable. Therefore, define statistical terms, abbreviations, and most symbols.* However, the following abbreviations may be used without definition: ANOVA (analysis of variance), CI (Confidence interval), r (coefficient of correlation, sample), r^2 (coefficient of determination, sample), R (coefficient of multiple correlation), R^2 (coefficient of multiple determination), CV (coefficient of variation), df (degrees of freedom), n (number of observations), NS (non significant), P (probability (level of significance)), SD (standard deviation), SEM (standard error of the mean), t (statistical datum derived in Student's t test), F (variance ratio). Use mean(SD) for mean and standard deviation, for example "The mean(SD) was 19.2(2.3)". Median, range etc. are written out in text and tables. Specify the computer software used. Authors are advised to consult a statistician or a person with in-depth statistical knowledge.

Results

Present your results in logical sequence giving the main or most important findings first, usually in past tense, without subjective comments and reference to previous literature. For clarity, the results section may have subheadings. The Result section is not the place for interpretation of the data, and must not include any references to other articles.

Do not repeat in the text, data easily found in the tables or illustrations (double documentation is not acceptable). Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid non-technical uses of technical terms in statistics, such as "random", "normal", "significant", "correlations," and "sample."

Tables

Present each table on a separate sheet. Do not submit tables as graphics but use the table facility of most word processors. Format the table as you expect it to appear in print and therefore hide internal vertical and horizontal lines. Number the tables consecutively in Roman numerals and give each a short descriptive heading. Give each column a short or abbreviated head. Place explanatory matter in footnotes to the table, not in the heading. Explain all non-standard abbreviations in footnotes to the table.

If data from another published or unpublished source are used, obtain permission and acknowledge fully. As far as possible, tables have to be self-explanatory and understandable without reference to the text of the article.

Figures

Upload figures (illustrations) in electronic form in JPG or TIFF file format only. Optimize the size of the file for printing with 800 DPI for line graphics and 300 DPI for halftone figures, but *depending on the character of the article and the quality of those electronic files, the author(s) may be asked to supply files of higher quality.* Consult the editor if you have special figures to submit such as camera-ready originals or transparencies. Authors will be charged for the extra cost of reproducing illustrations in color.

Make sure that letters, numbers, and symbols added to illustrations are clear, in proportion to each other, and large enough to be legible when reduced for publication. Refer to the journal

and decide whether the figure is to cover one, one-and-a-half, or two columns of the journal when printed, and then plan the figure accordingly.

Create line drawings using dedicated professional software, not spreadsheets. Prepare the figures in proportion to each other, so that lettering, numerals, and symbols in different figures will be roughly the same size after reduction. Use sans-serif fonts for lettering the axes, and capitalize only the first letter. If submitting photographs, prepare them as near to the size they will appear in print as possible, and, if magnification is significant, indicate this by a bar on the print, *not* by a magnification factor in the figure legend. Arrows, letters, etc., affixed to a photograph in a file must be secure.

Give each figure a legend containing sufficient information to make it intelligible without reference to the text, and type all the legends together, double-spaced, on a separate page(s). Consider all illustrations as figures and number them consecutively in Arabic numerals. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce it. If images of persons are used, render the subject unidentifiable (not only a black bar covering the eyes), and obtain written permission to use them, and submit with the manuscript.

Discussion

The Discussion section should present the interpretation of the findings. This section is the only proper section for subjective comments. Authors are strongly urged to avoid undue repetition of what has already been reported in the results section, or introduced in the introduction.

The last paragraph should be dedicated to the conclusions of the study. There ought to be a correspondence between the aims and hypotheses in the end of the introduction and conclusions.

Acknowledgements

Acknowledge the source of financial support here, and state any links to companies or other commercial organizations. Authors are responsible for obtaining permission from everyone acknowledged by name (see section on Cover Letter above).

References

References in languages not understood by all scientists must be avoided. Therefore, only articles written in English should be used as references. This applies also to law texts, other official texts and internet sites. Furthermore, avoid references difficult to retrieve, e.g. old textbooks, journals not indexed in Medline, etc. Avoid references to websites, since these are often changed or removed.

References to 'personal communication' are permitted in the text only, not in the list of references, but should be avoided. Documentary evidence from the person quoted showing agreement with the quotation must be provided in the cover letter. A reference to 'unpublished work' (text only) must be supported by the names of all involved and included in the cover letter. The use of 'in preparation', 'private communication' and 'submitted for publication' is not allowed.

References in the text

The number of references should not normally exceed 40, and 20–30 references are frequently adequate. However, for review articles there is no upper limit. Number each reference consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in the text by Arabic numerals in square brackets. If more than one reference, separate them by a comma: [2,4-6,8]. Avoid putting references in tables and figure legends. Give cross-references by the name of the author followed by the appropriate number in parentheses, e.g. "Lagerlöf [1]

has reported ...”, “Oliveby & Lagerlöf [2] have reported ...”, or simply by giving the appropriate number in parentheses, e.g. “As has recently been reported [1] ...”. When there are three or more authors, give only the name of the first author, followed by ‘et al.’: “Oliveby et al. [1] have reported...”. Ensure that all listed references are cited in the text.

The Reference list

At the end of the paper references should be listed in numerical order, in the style shown in the following examples, preceded by the number. For reference list entries, follow the style set out in the examples below. Abbreviate the names of journals in accordance with *MedLine*. List the names of the first six authors in reference-list entries before adding ‘et al.’

Here are some examples to follow:

Journals

Standard journal article

- [1] Flink H, Tegelberg Å, Thörn M, Lagerlöf F. Effect of oral iron supplementation on unstimulated salivary flow rate: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Oral Pathol Med* 2006;35:540-7.
- [2] Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Källestål C, Lagerlöf F, et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: A systematic review. *Acta Odontol Scand* 2003;61:347-55.

Article in supplement or special issue

- [3] Fleischer W, Reimer K. Povidone iodine antiseptics. State of the art. *Dermatology* 1997;195 Suppl 2:3-9.

Corporate (collective) author

- [4] American Academy of Periodontology. Sonic and ultrasonic scalers in periodontics. *J Periodontol* 2000;71:1792-801.

Unpublished article

- [5] Garoushi S, Lassila LV, Tezvergil A, Vallittu PK. Static and fatigue compression test for particulate filler composite resin with fiber-reinforced composite substructure. *Dent Mater* 2006. In press.

Books and other monographs

Personal author(s)

- [6] Hosmer D, Lemeshow S. Applied logistic regression, 2nd edn. New York: Wiley-Interscience; 2000.

Chapter in book

- [7] Nauntofte B, Tenovou J, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O, Kidd EAM, editors. *Dental caries: The disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 7-27.

No author given

- [8] World Health Organization. Oral health surveys - basic methods, 4th edn. Geneva: World Health Organization; 1997.

More information about other reference types is available at www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, but observe some minor deviations (no full stop after journal title, no issue or date after volume, etc).

Abbreviations

Use only standard abbreviations. Consult *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 7th ed. ISBN 0-9779665-0-X, 2006. Explain any non-standard abbreviations (to be avoided if possible) in the text at first mention. Avoid abbreviations in the title of the article. Give tooth designations in accordance with the two digit system (ISO 3950-1977).

Proofs and offprints

One set of proofs (pdf) is sent to the corresponding author by e-mail. S/he is requested to return the proof, duly corrected, with the minimum possible delay. Follow the enclosed instructions. Authors are liable to pay the costs of correction of any errors not due to printer's errors. Offprints can be ordered by filling out the form accompanying the proofs. Authors will be charged USD 95 for each printed page in excess of 4 pages.

Copyright

It is a condition of publication that authors vest copyright in their articles, including abstracts, in Taylor & Francis. This ensures full copyright protection and dissemination of the article, and the journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the material elsewhere after publication provided that prior permission is obtained from Taylor & Francis. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. To view 'Copyright Transfer Frequently Asked Questions', please visit www.tandf.co.uk/journals/copyright.asp

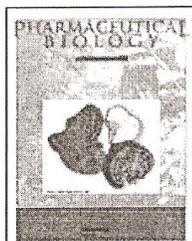
Extra issues

Proceedings from scientific meetings, monographs or other longer texts may be published as additional issues, if considered to have a significant scientific value. Further information may be obtained from the Editor-in-Chief.

ANEXO 2

Normas para submissão do Artigo 2

Journal Details



Pharmaceutical Biology

Published By: Informa Healthcare

Volume Number: 46

Frequency: 10 issues per year

Print ISSN: 1388-0209

Online ISSN: 1744-5116

[Subscribe Online](#) | [Free Sample Copy](#) | [Table of Contents Alerting](#) | [View Full Pricing Details](#)

Instructions for Authors

Submission of manuscripts:

Please submit your original manuscript through Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/nphb>. The file should be prepared using MS Word or WordPerfect. See the "Tables and Figures" and "Illustrations" sections of these instructions for table and figure file requirements. Each manuscript must be accompanied by a signed statement that the research is original and the information has not been reported in large part in a published article or contained in another paper that has been submitted or accepted for publication in print or electronic media. Each manuscript must be accompanied by a Manuscript Submission Agreement and an Author Contribution Form in order for it to be an acceptable submission.

Detailed instructions to authors may be found at <http://www.informaworld.com/nphb>. Briefly, all parts of the manuscript should be double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. The title page should contain the following elements: Title, author's names, affiliations, an abbreviated version of the title of no more than 40 characters (including spaces) for running heads, an abstract of about 250 words briefly summarizing the essential content, a maximum of 10 keywords (in alphabetical order), the full address of the corresponding author in a footnote: phone, fax, postal address, and e-mail address. The text may be divided into the following elements: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References. The references of contributions to *Pharmaceutical Biology* should be listed in alphabetical order by year and formatted in the style shown below. All units of measurement should

be given in metric or SI units. Botanical and chemical nomenclature should be consistent with Index Kewensis and Appendix IV of the Chemical Abstracts 2002 Index Guide, respectively. (Note that under this treatment trivial chemical names are acceptable where they will be commonly understood.) Trivial names for enzymes may be used but the provision of the Enzyme Commission number for the enzyme is strongly recommended. Similarly, the provision of the Chemical Abstracts registry numbers is encouraged. In all studies of plants or animals, specific identification should be made as to the material used, such as by citation of voucher specimen in herbarium or other collections, quoting name of collector, collection number (or date), place of collection, etc. Unless otherwise noted, it will be understood that such specimen will be found in the author's own collection or that of the institution at which the work was done. Antimicrobial studies must include MIC data; animal studies must be approved by a review board, or at least in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. For non-English speakers: a native English speaker should read the article before submission.

Manuscripts will be considered for publication as full-length research papers, notes, or reviews. Authors wishing to prepare a review on a special topic should contact the Editor prior to submission. As an exception, letters to the editor may be published when the situation warrants.

References:

Text citations should follow the Harvard system and thus put the last name of the first author and the year of publication within parentheses unless the author's name immediately precedes the citation [i. e. "recent work (Pezzuto, 2007)" (Pezzuto & Smith, 2005) or "recently Pezzuto et al. (2006)"]. References should be listed alphabetically by year. Issue number required only when each issue of a volume begins with page 1. Only citations from the primary literature should be included as references. References should list all authors. Journal titles should be abbreviated according to Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI). The format for references follows:

Standard journal article:

Single author: Addison A (1866): On the chemical pathology of the brain. *J Mental Sci* 12:1-21. *McAa Jell la an lec la ai e ile J Neurosci* 14:41-42. *run in* 14. *ur enntnis er se isc en irono i en Ark Zooi* 39A:121

Multiple authors: *San er J AS art ri le M 1991 i atrin an s c osis J Neurol Neurosurg Psychiat* 44:49. *Aserinsky ynch JA Mack M anko SP urn 19 o arison o eye otion in ake ulness an Mslee Psychophysiology* 22:1-1

Book: *inger S 1994 Origins of Neuroscience. A History of Explorations into Brain Function* New York: Oxford University Press pp 299-1

Chapter in Book: *Heath 1972 Psychosis an epilepsy similarities an differences in the anatomicologic substrate. In: Priele M ed. Temporal Lobe Epilepsy. Mania and Schizophrenia and the Limbic System* Basel:arger pp 1-11

Illustrations:

Illustrations submitted (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be clean originals or digital files. Digital files are recommended for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, TIFF, or PSD format only
- For editing, submit after the references, not embedded in text files

Color illustrations will be considered for publication however the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication. The charge for the first page with color is \$1,000. The next three pages with color are \$300 each. A custom quote will be provided for color art totaling more than 4 journal pages. Good quality color prints should be provided in their final size. The publisher has the right to refuse publication of color prints deemed unacceptable.

Tables and Figures:

Tables and figures/illustrations should not be embedded in the text but should be included at the end of the text file. A short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes suitably identified below. All units must be included. Figures should be completely labeled taking into account necessary size requirements. Captions should double space.

Proofs:

Page proofs are sent to the designated author. They must be carefully checked and returned within 4 hours of receipt.

Offprints:

The corresponding author of each article will receive one complete copy of the issue in which the article appears. Offprints or reprints of an individual article may be ordered from Informa Healthcare. A link to the ordering form is included at the proofs stage.

About this Journal

Aims & Scope

Abstracting & Indexing

Editorial Board

For Contributors

Copyright Assignment

Instructions for Authors

eJournal

Free Sample Copy

Online Contents

ANEXO 3

Questionário de entrevista aos pacientes atendidos no Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca.

FICHA DE COLETA

Ficha nº:.....

Data da coleta:.....

Nome do paciente: _____

Idade:

Sexo:.....

1) Usa prótese:

total _____ removível _____

2) mucu-suportada _____ dento-suportada _____ dento-mucu-suportada _____

3) Quanto tempo usa prótese? até 1 ano até 5 anos até 10 anos + 10 anos

4) Você costuma higienizar a prótese? Sim Não

5) Com que produto(s)? hipoclorito vinagre limão outro _____

6) Escova a dentadura? Sim Não

7) Com que frequência? 1x ao dia + de 1x ao dia semanalmente

8) Você dorme com a prótese? Sim Não

9) Você retira a prótese da boca em algum momento do dia? Sim Não

10) Por quanto tempo? 1 hora + de 1h até 12h até 1 dia + de 1 dia

11) E onde fica esta prótese? copo c/ líquido pano seco outro _____

12) Toma algum medicamento? Sim Não

13) Que tipo de medicamento? antidepressivo antihistamínico antibiótico
 antiinflamatório analgésico hiperglicemiantes

14) Faz ou fez algum tratamento antiviral ou quimioterápico ou radioterápico?
 Sim Não

15) Tem problema de açúcar? Sim Não

16) Apresenta alguma enfermidade? Sim Não

17) Você fuma? Sim Não

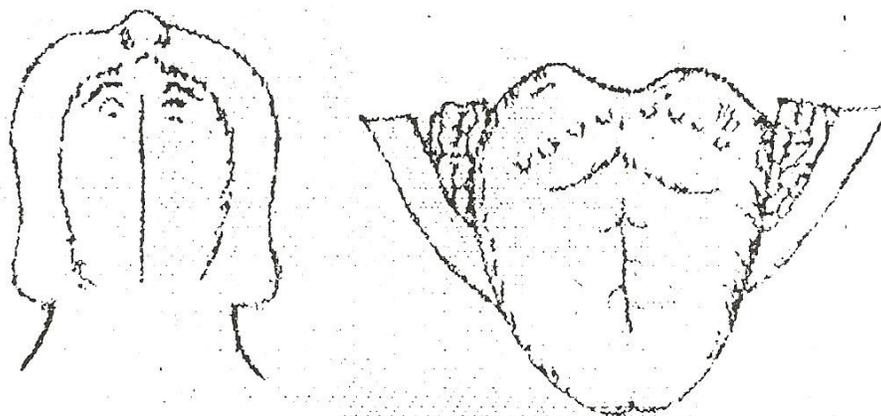
18) Biofilme localizado: no palato na dentadura ambos não tem

19) Prótese bem adaptada ou machucando ou balançando?

bem adaptada machucando frouxa

20) Estomatite: palato palato e língua língua

22) Desenho:



- 21) Já fez () ou usa () algum antifúngico: () Sim () Não
- 22) () Tópico () Sistêmico ou () Ambos
- 23) No caso do tópico: () Gel () Pomada
- 24) Qual(is)? _____
- 25) Há quanto tempo usa? () - de 1 mês () + de 1 mês () até 6 meses () até 1 ano
() + 1 ano
- 26) Com que frequência usa o antifúngico? () - de 1x/dia () 1x/dia () +

OBS:.....
.....
.....

ANEXO 4

Aprovação do projeto no Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia - UFPel.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 09 de janeiro de 2007

PARECER N° 036/2006

O Projeto de pesquisa intitulado “PESQUISA DE CANDIDA sp. NA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES COM CANDIDIÁSE ATRÓFICA CRÔNICA” está constituído de forma adequada, cumprindo, na sua plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução. , o

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Torriani', is written over a horizontal line.

Prof.Dr.Marcos Antônio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel

ANEXO 5

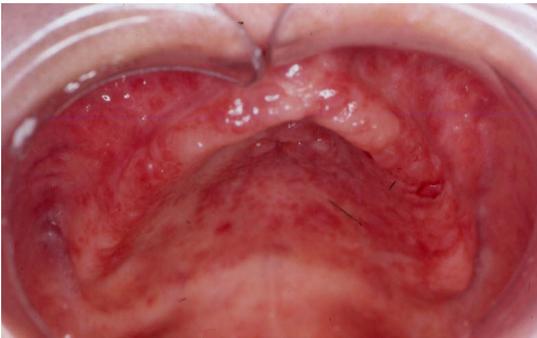
Apresentações clínicas das lesões eritematosas de CAC.



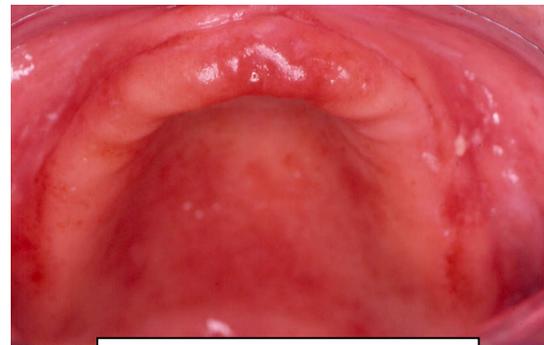
Lesões eritematosas puntiformes, máculas e micropápulas



Máculas



Eritema difuso



Eritema difuso, máculas e micropápulas



Eritema difuso



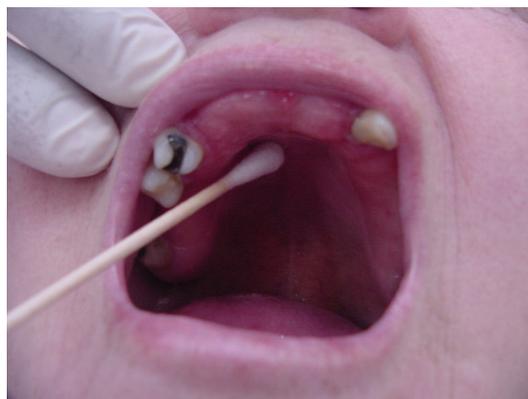
CAC (mácula) + candidíase pseudomembranosa (pseudomembrana)

ANEXO 6

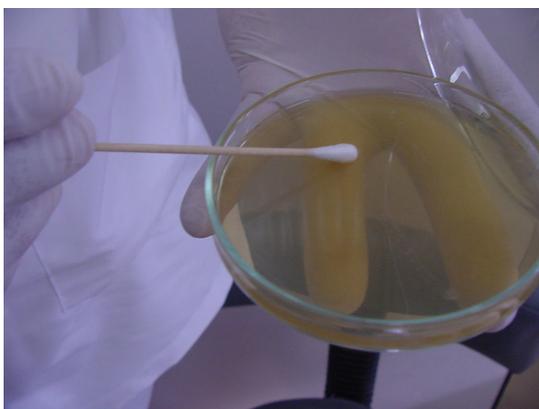
Procedimentos de colheita das amostras microbiológicas.



Avaliação da prótese



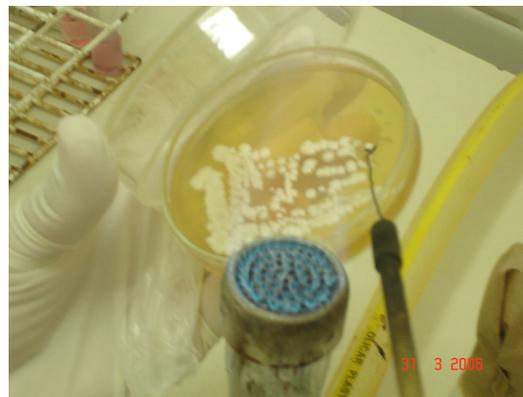
Colheita da amostra com swab estéril



Semeadura das amostras

Crescimento em aerobiose
36°C
24-48h

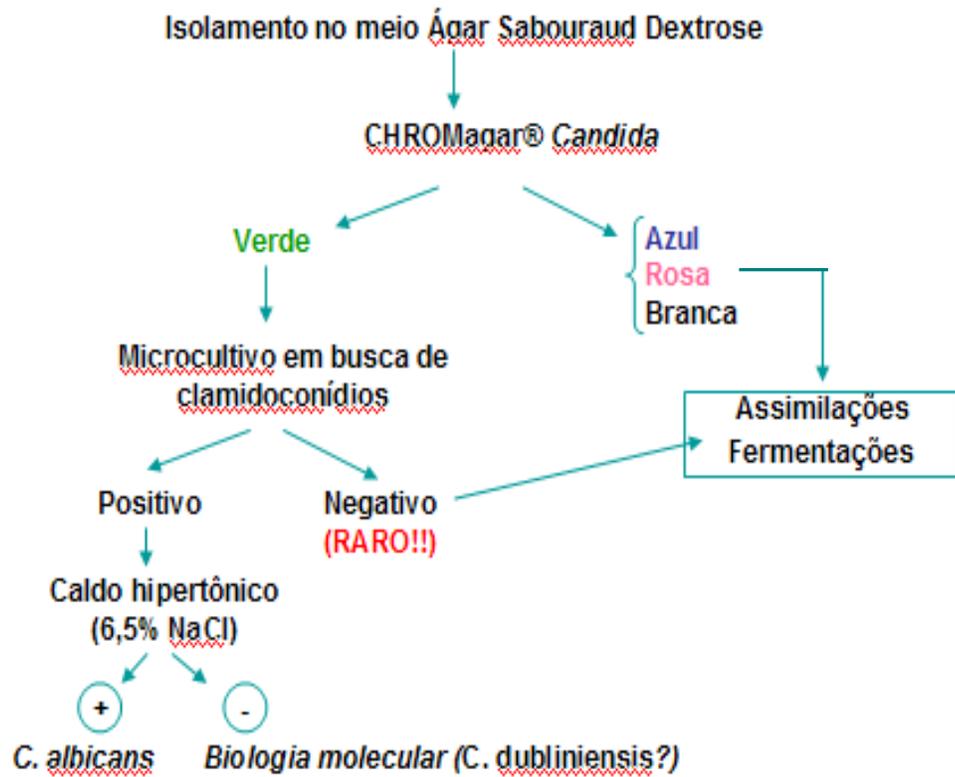
Isolamento da levedura



Repique das amostras

ANEXO 7

Protocolo de testes para identificação de espécies do gênero *Candida*.



UNIFESP, 2007

ANEXO 8

Plano Geral de Trabalho

Isolamento e identificação de *Candida* em pacientes com CAC e fatores associados

- Aplicação de questionário (identificação do paciente, dados demográficos, história médica e comportamento);
- Exame clínico intra-oral;
- Exame micológico;
- Identificação da levedura *Candida*;
- Análise estatística dos dados.

Atividade antimicrobiana

- Obtenção dos extratos etanólicos de *Mikania glomerata* e *M. hirsutissima* com a colaboração do CPQBA;
- Diluição dos extratos na concentração desejada;
- Determinação da CIM e da CBM;
- Teste de aderência à superfície de vidro;
- Ensaio antimicrobiano pela técnica de macrodiluição em caldo.