

Efeito do extrato da própolis e do digluconato de clorexidina sobre a formação de biofilme por *Candida albicans* em resina acrílica

Effect of propolis extract and chlorhexidine digluconate on the biofilm formation by Candida albicans in acrylic resin

João Vitor Oribka Roque*

Lilian Cristiane Baeza**

Eduardo Alexandre Loth***

Resumo

Objetivo: avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana do extrato da própolis (EP) e do digluconato de clorexidina (DCHX) na formação de biofilme por *Candida albicans* em resina acrílica termopolimerizada. Métodos: o efeito do EP e DCHX em biofilmes de *C. albicans* foi avaliado pela quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), pela quantificação da biomassa por cristal violeta e de polissacarídeos por safranina. Para tanto, *C. albicans* foram pré-aderidas em corpos de prova e somente em microplacas de poliestireno, posteriormente foi realizado o tratamento com diferentes concentrações de EP (221 µg/mL e 443 µg/mL) e DCHX (0,25% e 0,5%). Resultados: foi demonstrada uma redução significativa na formação de biofilme por *C. albicans* com ambas as substâncias testadas e em todas as concentrações. Conclusão: de acordo com os resultados, observou-se que ambos os tratamentos foram eficazes na redução do biofilme e que o EP, por ser um produto natural, de baixo custo e sem efeitos colaterais, representa uma alternativa inovadora para o tratamento da candidose oral em usuários de próteses removíveis.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Própolis. Clorexidina.

<http://dx.doi.org/10.5335/rfo.v25i1.10998>

* Acadêmico de Odontologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Departamento de Odontologia, Cascavel, Paraná, Brasil.

** Doutora em Microbiologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Departamento de Odontologia, Laboratório de Microbiologia Experimental, Cascavel, Paraná, Brasil.

*** Doutor em Patologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Laboratório de Microbiologia Experimental, Cascavel, Paraná, Brasil.

Introdução

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, há um grande número de idosos edêntulos, necessitando, por esse motivo, do uso de próteses totais (PT). Segundo dados do projeto “Brasil Sorridente”, entre os idosos de 65 a 74 anos, 23,9% necessitam de prótese total em pelo menos um maxilar e 15,4% necessitam de prótese total dupla, ou seja, nos dois maxilares¹. As próteses parciais removíveis, próteses totais convencionais, *overdentures* sobre raízes, *overdentures* sobre implantes, são amplamente usadas para restabelecer a saúde oral dos indivíduos. Dentre essas, as próteses removíveis são muitas vezes escolhidas como primeira opção num plano de tratamento, devido ao seu menor custo em relação à reabilitação fixa². No entanto, o uso de próteses dentárias removíveis pode gerar um microambiente propício para o crescimento de biofilmes em sua superfície³.

O biofilme é composto por uma comunidade microbiana complexa que se forma pela adesão e proliferação de microrganismos sobre as superfícies orais, incluindo os biomateriais. A capacidade de aderência às superfícies bióticas, como a mucosa do hospedeiro e abióticas, como a superfície da resina acrílica de próteses, é de fundamental importância no desenvolvimento microbiano^{3,4}. A resina acrílica termopolimerizada usada em bases de próteses é fornecida comercialmente em diversas formas, atualmente o sistema pó-líquido é o mais utilizado, devido às suas propriedades, ao fácil manuseio, ao rápido processamento laboratorial e ao custo acessível^{5,6}.

Os microrganismos orais depositam-se sobre a prótese dentária da mesma forma que se depositam nos dentes e na mucosa oral, sendo que a rugosidade da superfície da prótese está diretamente relacionada com maior adesão e consequente acúmulo desses. A rugosidade de superfície provoca adesão e retenção de *C. albicans*, microrganismo de importância específica na indução de candidoses⁷. O microambiente formado pela interface prótese-mucosa oral apresenta baixos níveis de oxigênio e baixo pH, o que, associado a má higienização bucal, má adaptação da prótese e redução do fluxo de saliva, pode favorecer o

desenvolvimento de um quadro de candidose⁸. *C. albicans* é a espécie mais comumente associada ao desenvolvimento dessa infecção fúngica, acometendo cerca de 65% dos portadores de próteses removíveis^{9,10}. Sua etiologia é multifatorial e os fatores predisponentes incluem tabagismo, doenças sistêmicas, alterações imunológicas, alergia ao monômero residual da prótese, hipossalivação e falta de higiene bucal e/ou da prótese¹¹.

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais humanos que geralmente residem em pele, trato gastrointestinal, sistema geniturinário, orofaringe e trato respiratório superior, sem causar danos a indivíduos saudáveis¹². *C. albicans* é um patógeno oportunista, isolado em 30% a 40% dos adultos saudáveis, e em 50% a 65% das pessoas usuárias de prótese removível^{13,14}. Entre os fatores de virulência, que influenciam esse quadro, podem-se citar a capacidade de aderência a dispositivos médicos ou células hospedeiras, o desenvolvimento de biofilme e a transição para forma filamentosa. As hifas permitem ao microrganismo invadir o tecido epitelial e penetrar nas células do hospedeiro. Em lesões de candidose, a invasão do epitélio bucal superficial é uma característica marcante, acompanhada por destruição e perda dessas células. Além disso, a formação de biofilmes por *Candida* está associada à falha do tratamento devido a um alto nível de resistência antifúngica¹⁵.

É desejável que os biomateriais usados na confecção de próteses odontológicas propiciem menor adesão microbiana, diminuindo assim a incidência de patologias infecciosas¹⁶. Imazato¹⁷ (2003) tem discutido as vantagens de adicionar agentes antimicrobianos dentro de materiais resinosos, com o intuito de impedir a formação de biofilme, e o uso de clorexidina pode ser uma opção. Produtos naturais são uma fonte promissora na busca de novos princípios ativos, que possam ser utilizados como terapia alternativa no tratamento de infecções oportunistas, quando o organismo se torna debilitado ou imunocomprometido.

Dentre os produtos naturais, a própolis tem sido um dos mais investigados. A própolis é uma resina proveniente das árvores coletada pelas abelhas *Apis mellifera* e contém inúmeras subs-

tâncias, como, por exemplo, flavonoides. Devido à grande variedade em sua composição química, apresenta inúmeras ações farmacológicas, como ação antimicrobiana (bacteriana e fúngica), anti-inflamatória e antitumoral¹⁸. O conhecimento sobre os problemas associados às infecções por *Candida* e o desenvolvimento de terapias alternativas, capazes de atenuar sua virulência, é de extrema importância¹⁹. Alguns trabalhos já demonstraram a inibição ou atenuação de fatores de virulência de *C. albicans* utilizando-se a própolis²⁰.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana do extrato da própolis (EP) comparado ao digluconato de clorexidina (DCHX) na formação de biofilme por *C. albicans* em resina acrílica.

Material e métodos

Microrganismo: Foi utilizada a cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028). Para todos os ensaios, as leveduras foram previamente ativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 24 horas à temperatura de 37°C e, posteriormente, foram repicadas em meio Agar Sabouraud Dextrose nas mesmas condições de incubação.

Confecção dos corpos de prova: Os corpos de prova foram confeccionados, utilizando-se matrizes metálicas, contendo cavidades de 10 mm de diâmetro x 2 mm de espessura, a partir de resina acrílica termopolimerizada. Levando-se em consideração que cada substância foi testada em triplicata, foram confeccionados 18 corpos de prova.

Extrato de própolis e digluconato de clorexidina: O EP utilizado foi adquirido comercialmente da Apis Flora® na concentração de 30% (v/v), com álcool 96°GL como líquido extrator, e o DCHX da Biodinâmica® na concentração 2%, que posteriormente foi diluído até as utilizadas no estudo.

Ensaio de biofilme: O biofilme de *C. albicans* foi realizado de acordo com Chandra *et al.*²¹ (2001). A partir das leveduras previamente cultivadas, foi preparado um inóculo. As células

foram suspensas em tampão salina fosfato (PBS 0,01M de pH 7,2) e ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL por contagem em câmara de Neubauer. Foram adicionados à placa de 24 poços, contendo os corpos de prova, 500 µL do inóculo diluído em meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS 0,165M de pH 7,2 (ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico, Sigma), contendo 2% de glicose. Para as placas de 96 poços, foram utilizados 200 µL do inóculo, sem os corpos de prova. Após isso, as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura de 37°C, para aderência inicial das células. Como controle positivo, leveduras foram incubadas somente com meio de cultura. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os poços foram gentilmente lavados três vezes com PBS 0,01M, para remoção das células não aderidas. Posteriormente, foram então adicionadas as substâncias antimicrobianas testadas em questão, ambas em duas concentrações diferentes. O EP foi ajustado nas concentrações de 221 µg/mL e 443 µg/mL, enquanto o DCHX foi diluído para concentração de 0,25% e 0,5%. Novamente, as placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C. Decorrido esse período, o sobrenadante foi removido e foram realizadas três lavagens dos poços com solução de PBS 0,01M. Foram adicionados 1.000 µL de PBS 0,01M em cada poço das placas contendo os corpos de prova e agitado em vórtex por 5 minutos. Em seguida, 10 µL do sobrenadante foram semeados em placas contendo meio de cultura e incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior contagem de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias).

Quantificação da biomassa por coloração de cristal violeta: O método de quantificação da biomassa por coloração cristal violeta foi adaptado da técnica descrita por Mowat *et al.*²² (2007). Biofilmes formados nas placas sem os corpos de prova tiveram o meio de cultura removido e as células aderentes foram lavadas três vezes com solução de PBS 0,01M. Após secagem, solução de violeta cristal a 0,5% foi adicionada a cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados com água destilada estéril e o biofilme descorado pela

adição de solução de etanol 95%. Transferiu-se a solução de cada poço para uma placa de 96 poços que foi analisada em leitor de microplacas a 570 nm.

Quantificação do material polissacarídeo por coloração de safranina: O material polissacarídico produzido pelo biofilme foi quantificado por coloração com safranina, foi realizado de acordo com Seidler *et al.*²³ (2008). Após a formação do biofilme, a matriz extracelular foi corada com solução de safranina durante 5 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas até o sobrenadante ficar claro e foram lidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 472 nm.

Análise estatística: Os dados foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Foi demonstrada uma redução significativa na formação de biofilme por *Candida albicans* com ambas as substâncias testadas. A avaliação do número de UFCs após o tratamento dos corpos de prova evidenciou uma diminuição no número de colônias em relação ao controle, com todas as substâncias testadas. O DCHX mostrou maior redução no número de colônias em relação ao EP, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantificação do número de UFC/mL de *Candida albicans* após tratamento dos corpos de prova com extrato de própolis e digluconato de clorexidina.

Tratamentos	UFC/mL (média dos valores)
Extrato de própolis 221 µg/mL	2,6 x 10 ⁴
Extrato de própolis 443 µg/mL	1,1 x 10 ⁴
Digluconato de clorexidina 0,25%	3,7 x 10 ³
Digluconato de clorexidina 0,5%	1,5 x 10 ²
Controle positivo	2,0 x 10 ⁶

Fonte: autores.

Em relação ao ensaio para a quantificação de biomassa, realizado por coloração de cristal violeta, o EP 221 µg/mL foi o que apresentou maior quantidade de biomassa em relação aos demais,

ou seja, menor efeito antimicrobiano, porém, observou-se diminuição de 38% quando comparada ao controle. A substância mais eficiente foi o DCHX 0,5%, tendo uma diminuição avaliada em 88% na formação de biomassa (Figura 1).

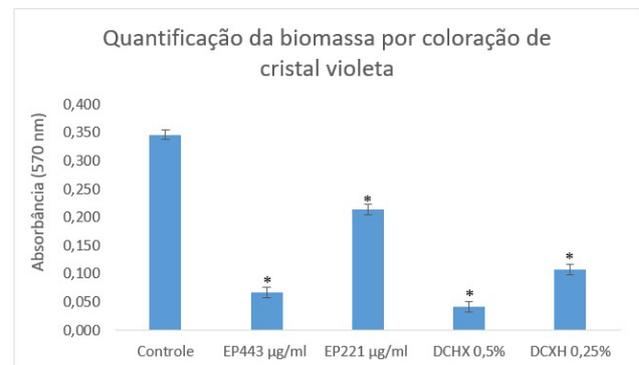


Figura 1 – Quantificação da biomassa corada por cristal violeta e submetida à leitura por espectrofotometria em comprimento de onda de 570 nm; tratamento com extrato de própolis (EP) nas concentrações de 221 µg/mL e 443 µg/mL e digluconato de clorexidina (DCHX) nas concentrações de 0,5% e 0,25%; Teste t Student foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas

* representa $p < 0,05$.

Fonte: autores.

Os resultados da quantificação de material polissacarídeo, corados com safranina, corroboram os resultados anteriores. O potencial inibitório antimicrobiano do DCHX é superior ao do EP (Figura 2).

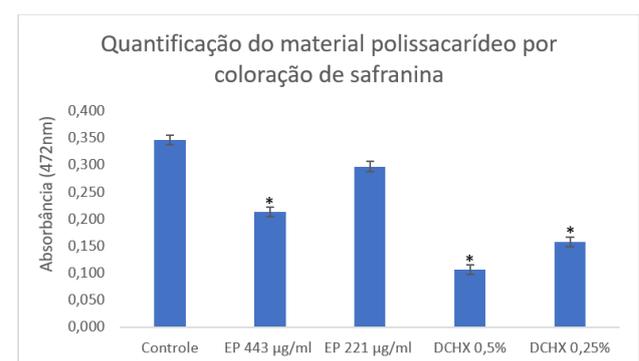


Figura 2 – Quantificação do material polissacarídeo corado por safranina e submetido à leitura por espectrofotometria em comprimento de onda de 472 nm; tratamento com extrato de própolis (EP) nas concentrações de 221 µg/mL e 443 µg/mL e digluconato de clorexidina (DCHX) nas concentrações de 0,5% e 0,25%; Teste t Student foi usado para análise estatística e as barras de erro representam o desvio padrão das três réplicas biológicas.

* representa $p < 0,05$.

Fonte: autores.

Discussão

A incidência de candidose nas últimas duas décadas teve um incremento significativo, e *C. albicans* ainda é a espécie mais prevalente. Esse fato pode ser explicado pela menor sensibilidade das leveduras aos agentes antifúngicos comumente empregados na prática clínica. Além disso, a expressão dos fatores de virulência, como transição morfológica e formação de biofilme, tem sido associada a dificuldades no tratamento. A crescente incidência de patógenos resistentes a medicamentos, um número limitado de opções terapêuticas e a toxicidade dos compostos tradicionais chamaram a atenção para a atividade antimicrobiana dos produtos naturais, incentivando o desenvolvimento de tratamentos alternativos²⁰.

As concentrações do EP foram determinadas em estudo anterior, no qual 221 µg/mL foi a concentração subinibitória e 443 µg/mL foi a concentração inibitória mínima. Como se sabe, os biofilmes são uma comunidade de microrganismos que apresentam uma resistência de 10 a 100 vezes maior que as células planctônicas²⁴. Assim, as concentrações de EP utilizadas foram baseadas nesse conceito.

A avaliação do número de UFCs após o tratamento dos corpos de prova evidenciou uma diminuição no número de colônias em relação ao controle, com todas as substâncias testadas. O DCHX mostrou maior redução no número de colônias em relação ao EP, como demonstrado anteriormente na Tabela 1.

A coloração com cristal violeta foi utilizada para a quantificação da biomassa. O cristal violeta se liga a moléculas de superfície negativamente carregadas e em polissacarídeos da matriz exopolimérica dos biofilmes. Portanto, quanto maior a quantidade de material biológico, maior o valor de absorvância²³. Azeredo *et al.*²⁵ (2017) publicaram uma revisão a fim de destacar as vantagens e as limitações de vários métodos utilizados no estudo de biofilmes. Eles destacaram como vantagens do emprego da técnica de cristal violeta a versatilidade, pois pode ser empregado para uma ampla gama de microrganismos e o alto rendimento.

Em relação ao resultado do ensaio para a quantificação de biomassa, o EP 221 µg/mL foi

o que apresentou maior quantidade de biomassa em relação aos demais, ou seja, menor efeito antimicrobiano, porém, observou-se diminuição de 38% quando comparado ao controle. Tal resultado confirma o discutido por Tobaldini-Valerio *et al.*²⁰ (2016) para o promissor uso da própolis como terapia alternativa no tratamento de infecções fúngicas. A substância mais eficiente foi o DCHX 0,5%, tendo uma diminuição avaliada em 88% na formação de biomassa.

Nota-se ainda que o EP 443 µg/mL apresentou maior eficiência que o DCHX 0,25%, o que justifica o uso diário do EP no tratamento da candidose oral em relação ao digluconato de clorexidina, devido ao fato de essa não apresentar efeitos colaterais e possuir maior eficácia antimicrobiana.

A quantificação do material polissacarídeo foi realizada por coloração com safranina, que tem sido amplamente utilizada para quantificar a formação de biofilme. Seidler *et al.*²³ (2008) descreveram a capacidade da safranina de corar estruturas polares e componentes da parede celular fúngica e polissacarídeos da matriz extracelular.

Os resultados da quantificação de material polissacarídeo corroboram novamente os resultados anteriores. O potencial inibitório antimicrobiano do DCHX é superior ao do EP, no entanto, essa substância pode provocar alterações orais como a alteração na coloração dos elementos dentários, perda do paladar, queimaduras no tecido mole, xerostomia, lesões descamativas, ulcerações na mucosa e gosto residual desagradável na boca²⁶. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o limite de concentração do DCHX em enxaguatórios bucais não deve ultrapassar a concentração de 0,3% (Anvisa – RCD nº 29/2012). Vários estudos têm mostrado a atividade antimicrobiana do EP, e essa bioatividade tem sido atribuída à atividade sinérgica entre seus vários componentes biológicos, principalmente compostos fenólicos e flavonoides²⁷. Ota *et al.*²⁸ (2001), observaram uma diminuição no número de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* na saliva dos pacientes usuários de prótese total que fizeram uso de EP hidroalcoólico. Tendo em vista as dificuldades e os vários fatores que interferem no tratamento da estomatite protética com antifúngicos, são necessárias outras alternativas que possam ser mais efi-

cazes no tratamento dessa infecção, levando-se em consideração os efeitos colaterais para o paciente. O EP é um produto de uso tópico e, portanto, de fácil aplicação, possuindo custo menos elevado quando comparado à clorexidina.

Conclusão

A formação de biofilme é um mecanismo que permite que os microrganismos se tornem colonizadores persistentes, resistentes ao sistema imunológico do hospedeiro e ao efeito de medicações. O presente estudo mostrou que tanto o digluconato de clorexidina como o extrato da própolis apresentam um potente efeito inibitório sobre o biofilme de *Candida albicans*. Esse é um dado muito promissor, considerando-se a complexidade no tratamento das candidoses orais e o fato de essa ter sido relatada como problema de saúde pública, com alta incidência em usuários de próteses removíveis. Então, o extrato da própolis é uma alternativa eficaz no tratamento, visto que inibe a formação de biofilme pelo principal agente etiológico da infecção.

Abstract

Objective: to evaluate in vitro the antimicrobial action of propolis extract (EP) and chlorhexidine digluconate (DCHX) in the biofilm formation by *Candida albicans* in thermopolymerized acrylic resin. Methods: the effect of EP and DCHX on *C. albicans* biofilms were evaluated through the quantification of Colony Forming Units (CFU's), the quantification of biomass by violet crystal and polysaccharides by safranin. For this purpose, *C. albicans* were pre-adhered to specimens and only on polystyrene microplates and subsequently the treatment was performed with different concentrations of EP (221 µg/mL and 443 µg/mL) and DCHX (0.25% and 0,5%). Results: a significant reduction in the biofilm formation by *C. albicans* was demonstrated, with both substances tested and in all concentrations. Conclusion: according to the results, it was observed that both treatments were effective in reducing biofilm and EP, being a natural product, low cost and without side effects, represents an innovative alternative for the treatment of oral candidiasis in users removable dentures.

Keywords: *Candida albicans*. Propolis. Chlorhexidine.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: principais resultados. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2011.
2. Moimaz SAS, Santos CLV, Pizzatto E, Garbin AS, Saliba NA. Outlines for the usage of complete denture prostheses in seniors and its evaluations of effectiveness and its cleansing. *Bras Dent Sci* 2004; 7(3):72-8.
3. Williams DW, Jordan RPC, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, *et al.* Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol* 2013; 5(2):1-8.
4. Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol* 2011; 301(5):417-22.
5. Lai CP, Tsai MH, Chen M, Chang HS, Tay HH. Morphology and properties of denture acrylic resins cured by microwave energy and conventional water bath. *Dent Mater* 2004; 20(2):133-41.
6. Machado C, Sanchez E, Shereen SA, Uribe JM. Comparative study of the transverse strength of three denture base materials. *J Dent* 2007; 35(12):930-3.
7. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont* 2000; 13(2):136-40.
8. Morse DJ, Smith A, Wilson MJ, Marsh L, White L, Posso R, *et al.* Molecular community profiling of the bacterial microbiota associated with denture-related stomatitis. *Sci Rep* 2019; 9(1):10228.
9. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J* 2012; 23(5):547-54.
10. Hahnel S, Rosentritt M, Bürgers R, Handel G, Lang R. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology* 2012; 29(2):383-91.
11. Gacon I, Loster JE, Wieczorek A. Relationship between oral hygiene and fungal growth in patients: users of an acrylic denture without signs of inflammatory process. *Clin Interv Aging* 2019; 14(2):1297-1302.
12. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10(2):95-105.
13. Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia* 2010; 169(5):365-72.
14. Abbeele AV, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology* 2008; 25(4):222-8.
15. Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J* 2010; 55(1):48-54.
16. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37(4):328-36.
17. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003; 19(6):449-57.
18. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim NPJ. Propolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Brazilian J. Pharmacogn* 2008; 18(3):447-54.
19. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125(1):3-13.

20. Tobaldini-Valerio FK, Mendonça PSB, Rosseto H, Bruschi M, Henriques M, Negri M, *et al.* Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiol* 2016; 11(2):1035-46.
21. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, *et al.* Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 2001; 80(3):903-8.
22. Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2007; 56(9):1205-12.
23. Seidler MJ, Salvenmoser S, Muller FM. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(11):4130-6.
24. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Microbiol Rev* 2012; 36(2):288-305.
25. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, *et al.* Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 2017; 43(3):313-51.
26. Gold JA. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Operative Dentistry* 2018; 33(6):710-6.
27. Al-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci* 2012; 9(9):793-800.
28. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimuzu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 2001; 44(10):375-8.

Endereço para correspondência:

João Vitor Oribka Roque
Departamento de Odontologia, Laboratório de
Microbiologia Experimental, Universidade Estadual
do Oeste do Paraná
Rua Jatobá, 379, Parque Verde
CEP 85807-676 – Cascavel, PR, Brasil
Telefone: (45) 98800-1916
E-mail: jv.oribkaroque@gmail.com

Recebido: 12/05/20. Aceito: 14/08/20.