



**INSTITUTO SUPERIOR
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NORTE**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE DE
ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DE PRÓTESES
REMOVÍVEIS A TRÊS AGENTES ANTIFÚNGICOS E UM
ÓLEO ESSENCIAL (ALDEÍDO CINAMÓNICO)**

Dissertação apresentada no Instituto Superior Ciências Saúde-
Norte, para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Orientadora: Professora Doutora Cristina Coelho

Maria Arminda Oliveira de Sá Santos

Dezembro 2011

Ao André
Ao Daniel
À minha irmã
Aos meus pais

Agradecimentos

Agradecimentos

Neste momento é imprescindível agradecer a um conjunto de pessoas sem as quais não teria sido possível realizar este trabalho

Agradeço à direcção do Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte e ao director do curso de Medicina Dentária, Professor Doutor Joaquim Moreira, pelo apoio institucional.

Agradeço às funcionárias da Clínica Dentária de Gandra pela disponibilidade e pelo bom ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram ao longo destes anos.

Agradeço ao Dr. Rui Sousa pelo apoio informático prestado no final da elaboração deste trabalho.

Agradeço aos colegas e docentes do mestrado de Reabilitação Oral, em particular à Liliana e ao Sérgio, pelos conhecimentos partilhados.

Agradeço à Professora Doutora Filomena Salazar, pelo apoio demonstrado sempre que apresentei o trabalho fora da instituição.

Agradeço à Professora Doutora Cristina Coelho, orientadora desta tese, pelos conhecimentos e experiência transmitidos, bem como pela disponibilidade sempre demonstrada, aspectos fundamentais para a elaboração desta tese.

Finalmente um agradecimento, especial, ao Professor Doutor José Manuel Mendes por estar sempre presente.

Resumo.....	VIII
Abstract.....	X
1 Introdução	1
2 Objectivos	5
3 Estado Actual do Conhecimento	7
3 1. Estomatite Protética.....	9
3.1.1. Etiopatogenia	10
3.1.2. Colonização das próteses	12
3.1.3. Características Clínicas.....	14
3.1.4. Diagnóstico	15
3.1.5. Tratamento.....	17
3.2. Métodos de Higienização das Próteses.....	20
3.3. Mecanismos de acção dos antifúngicos	22
3.4. Óleos essenciais – Aldeído Cinamónico.....	26
4 Materiais e Métodos.....	29
4.1. Ensaio preliminar	29
4.1.1. Preparação dos agentes antifúngicos	29
4.1.2. Teste de susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> aos agentes	30
4.2. Estudo experimental	32
4.2.1. Caracterização da amostra	32
4.2.2. Colheitas	33
4.2.3. Processamento das amostras	34
4.2.4. Pré-identificação das espécies de <i>Candida</i> em meio ChromID agar	34
4.2.5. Identificação das espécies de <i>Candida</i> com galeria ID32 C	35
4.2.6. Testes de susceptibilidade das espécies de <i>Candida</i> pelo método de difusão em agar:	36
4.2.7. Leitura dos testes de susceptibilidade.....	37
5 Resultados	39
5.1. Resultados do estudo preliminar	39
5.2. Resultados do estudo experimental.....	42
5.2.1. Dados dos pacientes.....	42
5.3. Resultados da identificação das espécies de <i>Candida</i>	45
5.3.1. Resultados do meio ChromID agar	47
5.3.2. Resultados da identificação com galerias ID32C	47
5.4. Resultados dos testes de susceptibilidade pelo método de difusão.....	48
5.4.1. Resultados quantitativos- Aldeído Cinamónico.....	48
5.4.2. Resultados quantitativos - Fluconazol.....	49
5.4.3. Resultados qualitativos - Aldeído Cinamónico	50
5.4.4. Resultados qualitativos- Fluconazol	53

6 - Discussão	58
7- Conclusões	64
8- Bibliografia	66
9 - Anexos	74

Índice de tabelas

Tabela 1 - Resultados dos halos de inibição dos 4 agentes testados realizados em triplicado e obtido por medição transversal e longitudinal.	40
Tabela 2 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação da medição transversal e longitudinal dos halos de inibição dos 4 agentes	40
Tabela 3 - Percentagens de superioridade do fluconazol relativamente aos outros agentes químicos.	41
Tabela 4 - Resultados da identificação das espécies de Candida	46
Tabela 5 - Resultados do Aldeído cinamónico	48
Tabela 6 - Resultados do Fluconazol	49

Índice de figuras

Fig. 1 - Suspensão de <i>Candida</i> ATCC(26278) com uma concentração de 0,5 na escala de Mc Farland	30
Fig. 2 - Sementeira da suspensão de <i>Candida</i> ATCC(26278) nas placas de agar Muller Hinton	31
Fig. 3 – Discos de papel de filtro estéreis a serem embebidos nas substâncias a testar	31
Fig. 4 - Discos de papel de filtro embebidos nas substâncias a testar colocados no centro de cada placa.	32
Fig. 5 - Guia de identificação do meio cromogénico da BioMérieux.....	35
Fig. 6 – Halo de inibição do Mycostatin®	39
Fig. 7 - Halo de inibição da Nistatina	39
Fig. 8 - Halo de inibição do Aldeído Cinamónico.....	39
Fig. 9 - Halo de inibição do Fluconazol	39
Fig. 10 – A-T) Halos de inibição do Aldeído Cinamónico de cada espécie isolada dos pacientes(1-20)	53
Fig. 11 - A-T) Halos de inibição do Fluconazol de cada espécie isolada dos pacientes (1-20)	56

Índice de gráficos

Gráfico - 1 Distribuição das idades dos pacientes.....	42
Gráfico - 2 Distribuição segundo o sexo.....	43
Gráfico - 3 Distribuição da Amostra por Idades.....	43
Gráfico - 4 Pacientes com estomatite protética	44
Gráfico - 5 Pacientes com estomatite protética e prótese mal adaptada	44
Gráfico - 6 Relação entre o total de pacientes com estomatite protética e com prótese bem adaptada	45

Índice de Anexos

Trabalhos desenvolvidos durante o Mestrado

Anexo nº1- Diploma de poster “Reabilitação oral em doente bruxomana - Caso clínico”- SPEMD 2009.

Anexo nº2- Diploma de poster “Reabilitação Oral fixa com recurso a implantes dentários e dentes naturais” Caso clínico”- SPEMD 2009.

Anexo nº3- Diploma de comunicação “Évaluation in vitro de la susceptibilité de *Candida albicans* à 4 agents chimiques”- GIRSO2010.

Anexo nº4- Diploma de poster “ Gouttière occlusale pour la propulsion mandibulaire”- GIRSO 2010.

Anexo 5- Diploma de poster “Avaliação in vitro da susceptibilidade da *Candida albicans* a 4 agentes químicos”- XIX Congresso da OMD.

Anexo 6- Diploma de comunicação- “Sensibilite in vitro à deux agents chimiques d’espèces de *Candida* presentes sur des prothèses dentaires amovibles”- GIRSO 2011

Resumo

Introdução: O uso de próteses dentárias é cada vez mais frequente, tendo em conta o significativo aumento da esperança média de vida. Devido a uma deficiente higiene oral e a reabilitações protéticas inadequadas, poderão desenvolver-se lesões nas mucosas orais, nomeadamente a estomatite protética. Um dos factores associados à patogénese desta lesão é a colonização da prótese por leveduras do género *Candida*.

Material e Métodos: Neste estudo avaliou-se a susceptibilidade de espécies de *Candida* isoladas das próteses de 20 pacientes, ao Fluconazol e ao Aldeído Cinamónico por terem sido os agentes que apresentaram maior halo de inibição no estudo preliminar no qual se avaliou a susceptibilidade de *Candida albicans* (ATCC 26278) a quatro agentes químicos (Fluconazol, Nistatina, Aldeído Cinamónico e Mycostatin®).

As espécies de *Candida* isoladas foram pré-identificadas pelo meio cromogénico chromID™ *Candida* (BioMérieux – Marcy – l'Étoile France). Assim todas as colónias que cresceram neste meio com cor azul foram pré-identificadas como *Candida albicans*. As outras colónias que apresentavam cor diferente, nomeadamente mistura de colónias azuis e rosa, colónias rosas e colónias brancas, foram assumidas como *Candida spp.* Posteriormente foram identificadas com galerias ID32 C (BioMérieux – Marcy – l'Étoile France).

Resultados: Das 20 amostras de *Candida* testadas, o Aldeído Cinamónico apresentou um maior halo de inibição com uma variação de comportamento significativamente reduzida. O Fluconazol apenas teve efeito antifungico em 3 das 20 amostras todas identificadas como *Candida glabrata*.

Discussão: Normalmente a espécie de *Candida* mais encontrada na estomatite protética é *Candida albicans* (Monroy 2007). No nosso trabalho, a identificação das espécies isoladas das 20 amostras, confirma esta informação sendo, no entanto, também identificadas outras espécies- *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida intermédia*.

Conclusões: Pudemos assim concluir que *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada das próteses dos pacientes do estudo. O Aldeído Cinamónico foi o agente químico que apresentou maior acção de inibição de crescimento das leveduras. A única espécie que apresentou susceptibilidade ao Fluconazol foi *Candida glabrata*.

Palavras-chave

Leveduras, próteses acrílicas, estomatite protética, antifúngicos, aldeído cinamónico

Abstract

Introduction: The use of dentures is becoming increasingly common, given the significant increase in life expectancy. Due to poor oral hygiene and inadequate prosthetic rehabilitation, oral mucosal lesions may develop, such as denture stomatitis. One of the factors on the pathogenesis of this lesion is the colonization of the prosthesis by fungi of the genus *Candida*.

Materials and methods: This study evaluated the susceptibility of *Candida* species isolated from dentures of 20 patients to Fluconazole and Aldehyde cinamon because they were the agents who had greater inhibition zone in the preliminary study in which the susceptibility of *Candida* spp. (ATCC 26278) was evaluated to four chemicals (Fluconazole, Nystatin, Mycostatin® and Aldehyde cinamon).

The isolated *Candida* species were pre-identified by the chromogenic medium (CHROM ID. AGAR) and later identified with ID32 C galleries.

Results: From the 20 samples of *Candida* tested, the Aldehyde cinamon showed a larger zone of inhibition with a significantly reduced variation in behaviour. Fluconazole took effect only in three of the 20 samples, showing resistance to this drug 17 samples tested.

In this study, we used the chromogenic medium for pre-identification of yeasts isolated from denture patients. Thus all the colonies that grew up with blue colours were pre-identified as *Candida albicans*. The other

colonies that had different colour, namely mixture of blue and pink colonies or pink and white colonies, were assumed as *Candida* spp. For the final identification of species it was used ID32C galleries.

Discussion: Usually, the *Candida* species most commonly found in denture stomatitis is *Candida albicans* (Monroy 2007) In our study, after identification of the species isolated from 20 samples, confirms this information. However, it were also identified other species, such as *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida intermedia*.

Conclusions: The most frequently isolated species of the prostheses of the study patients was *Candida albicans*. The drug with the highest share of growth inhibition of yeast Aldehyde was Cinamon. The species *Candida glabrata* was the only one that showed susceptibility to fluconazole.

Keywords

Yeasts, removable dentures, denture stomatitis, antifungal agents, aldehyde cinamon

1.Introdução

1 Introdução

A estomatite protética define-se como um processo inflamatório da mucosa de suporte de uma prótese dentária removível parcial ou total (1,2), localizando-se mais frequentemente na arcada superior, designadamente ao nível do palato (2). A sua incidência varia de 11a 67% em portadores de próteses removíveis (3) e é de aproximadamente 50% em portadores de próteses totais (4).

Esta patologia tem como factores predisponentes:

- A alteração da fisiologia local pelo uso da prótese;
- Os traumatismos causados pela prótese;
- A acumulação de calor;
- A fermentação e putrefacção de restos alimentares;
- As reacções alérgicas aos materiais das próteses;
- A diminuição das resistências devido a alterações sistémicas do organismo;
- Factores infecciosos como os microrganismos constituintes da flora normal da cavidade oral. (5,6)

Destes factores predisponentes devemos dar especial atenção aos microrganismos constituintes da flora normal, especialmente aos fungos leveduriformes do género *Candida*, uma vez que estes são os agentes microbianos mais relacionados com a estomatite protética (6,7,8).

Embora *C. albicans* seja o principal agente patogénico, outras espécies podem também estar envolvidas nessas infecções, como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* que têm vindo a ser crescentemente descritas (9,10, 11, 12). Sendo *Candida spp.* um fungo comensal do organismo humano, é necessário que ocorram determinadas circunstâncias para que se torne patogénico (13). A presença de uma prótese, por si só, impede a normal auto-limpeza e massagem da mucosa de suporte e o seu contacto permanente com a saliva, criando um ambiente propício ao crescimento e adesão microbianos, nomeadamente ao crescimento e adesão de fungos deste género.

Este crescimento e adesão de fungos vão originar um biofilme, que depois de formado, torna-se difícil de eliminar.

Torna-se assim importante evitar que as próteses sejam colonizadas pelos microrganismos em particular *Candida spp.*

De modo a garantir as condições funcionais do sistema estomatognático e, ao mesmo tempo, a integridade dos tecidos de suporte, torna-se fundamental a orientação de uso e higiene, bem como, o acompanhamento periódico das próteses muco-suportadas ou dento-muco-suportada, após a sua colocação (14).

De modo a uma erradicação eficiente dos fungos do género *Candida* das superfícies de contacto das próteses e, conseqüentemente a um decréscimo da prevalência de estomatite protética, torna-se fundamental

uma desinfecção eficaz das próteses dentárias. Assim, é importante desenvolver estudos com o objectivo de se chegar a um produto químico eficaz no tratamento desta patologia, uma vez que os tratamentos disponíveis mostram-se apenas eficazes enquanto dura o tratamento (Jean et al 2003)

2 Objetivos

2 Objectivos

1 - Avaliar a susceptibilidade “*in vitro*” de *Candida albicans* (ATCC 26278) a três anti-fúngicos (Mycostatin®, Nistatina e Fluconazol) e a um óleo essencial (Aldeído Cinamónico).

2 - Avaliar a prevalência de espécies de *Candida* em próteses removíveis e sua associação com a estomatite protética.

3 - Avaliar a susceptibilidade “*in vitro*” das estirpes isoladas aos dois agentes químicos que demonstraram maior eficácia na inibição de *Candida albicans* ATCC.

3. Estado Actual do Conhecimento

3 Estado Actual do Conhecimento

Numa população cada vez mais envelhecida, pelo aumento da esperança média de vida, os médicos dentistas são obrigados a preocuparem-se cada vez mais com a substituição dos dentes perdidos ao longo da vida, ou seja, com a prostodontia (14).

Em 1994 a Academia de Prostodontia definiu esta área como o ramo da Medicina Dentária relacionado com o restabelecimento e manutenção da função, o bem-estar, o aspecto, e a saúde da cavidade oral do paciente mediante a restauração dos dentes naturais ou a substituição dos dentes ausentes e dos tecidos orais e maxilofaciais contíguos por substitutos artificiais. (15)

Esta substituição torna-se fundamental para se conseguir estabelecer o equilíbrio do sistema estomatognático, ou seja, criar condições sãs, baseadas na relação anatómica entre a oclusão dentária, a musculatura, a ATM e o sistema nervoso central (16). O restabelecimento deste equilíbrio pode ser efectuado recorrendo a dois tipos de reabilitação oral: reabilitação oral com prótese fixa e reabilitação oral com prótese removível.

Quando o paciente, por diversos factores (normalmente económicos) opta por uma reabilitação com prótese removível, está a optar por uma reabilitação que consiste na substituição dos dentes perdidos através de

próteses desenhadas para serem removidas pelo paciente. Estas próteses removíveis podem ser divididas em próteses totais ou parciais, sendo que as próteses parciais removíveis podem ainda ser divididas em extra-coronárias ou intra-coronárias dependendo do tipo de retenção que se utiliza para as manter na boca. Pode-se, ainda dividir as próteses removíveis em muco-suportadas, dento-suportadas e dento-mucosuportadas. As dento-mucosuportadas foram classificadas por Kennedy em 4 classes:

- Classe I- desdentado bilateral posterior;
- Classe II- desdentado unilateral posterior;
- Classe III- desdentado unilateral posterior incompleto;
- Classe IV- desdentado do bloco incisivo ou canino.

Se for tido em conta o tipo de material usado na confecção das próteses removíveis podemos dividi-las em próteses acrílicas e próteses esqueléticas. Podendo as esqueléticas ser confeccionadas por uma liga de cromo-cobalto, de titânio ou de cromo níquel.

As próteses esqueléticas são consideradas dentomuco-suportadas enquanto que as acrílicas são preferencialmente muco-suportadas. As primeiras diferenciam-se, ainda, das acrílicas no que diz respeito aos meios de retenção que são conseguidos através de ganchos pré-formados ao contrário das próteses acrílicas que têm na sua constituição ganchos adaptados.

Após a colocação de uma prótese na cavidade oral de um paciente, surgem com frequência, lesões da mucosa oral. Estas lesões podem representar reacções agudas ou crónicas à placa dentária microbiana, uma reacção aos componentes do material da base da prótese ou uma lesão mecânica provocada pela prótese (17). As lesões constituem um grupo heterogéneo, relativamente à patogenia, estando incluída a estomatite protética, a queilite angular, as úlceras traumáticas, a hiperplasia irritativa por prótese e carcinomas orais.

3 1. Estomatite Protética

A estomatite protética pode ser definida como o conjunto de alterações inflamatórias que se observam sob uma prótese removível (18).

Em 1990, Budtz-Jorgensen, descreveu as lesões de estomatite protética como lesões caracterizadas por eritema difuso ou hiperplasia papilar inflamatória e concluiu que a estomatite protética afecta com maior frequência a mucosa palatina em cerca de 50% dos portadores de próteses removíveis totais ou parciais (30). Em 1999, este mesmo autor, acrescentou que esta patologia é mais frequente no sexo feminino (4).

Batista e col. em 1999, acrescentaram mais à definição de estomatite protética, descrevendo esta patologia como sendo a alteração que acomete a mucosa de suporte das próteses removíveis e que se caracteriza por hiperemia, edema e congestão, acompanhados algumas

vezes por petéquias hemorrágicas, podendo a inflamação ser moderada ou intensa e raramente o processo é sintomático (20).

Uma vez que esta patologia afecta uma grande parte dos pacientes portadores de próteses removíveis torna-se pertinente estudá-la mais detalhadamente.

3.1.1. Etiopatogenia

Budtz-Jorgensen, 1974 e Bergendal, 1982 afirmaram que a estomatite protética não é uma entidade patológica específica já que existem vários factores que podem desencadear esta patologia. Para estes autores, as infecções bacterianas, a irritação mecânica ou uma reacção alérgica provocada pelos componentes do material da base da prótese, são tidos como importantes factores causais, não deixando de realçar o importante papel das espécies de *Candida* (21,22).

Assim, torna-se fácil perceber que a estomatite protética é tida pela comunidade científica, como uma patologia com carácter multifactorial.

Em 2005, Monroy TB, após uma revisão bibliográfica, descreveu a estomatite protética como uma patologia de carácter multifactorial uma vez que esta se encontra associada à presença de vários microrganismos tais como *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* e em particular, *Candida* spp. A presença

constante da prótese, o pH ácido da saliva, o alto consumo de hidratos de carbono, o tratamento antibiótico prolongado, a terapia hormonal, assim como doenças sistémicas (diabetes *mellitus* ou hipertensão arterial), que têm repercussão directa nas condições ambientais da cavidade oral, também têm sido factores envolvidos na etiopatogenia da estomatite protética (23).

Golecka M, em 2006, acrescentou ainda aos factores etiológicos desta patologia a síndrome de Sjögren, uma vez que os doentes que apresentam esta síndrome, apresentam uma redução do fluxo salivar, provocando assim uma diminuição nos mecanismos de defesa contra as infecções fúngicas (24).

Os doentes que são submetidos a tratamentos de rádio e quimioterapia também são mais vulneráveis a este tipo de infecções, uma vez que são doentes que apresentam graus elevados de xerostomia, ficando assim mais susceptíveis à estomatite protética (25).

Está ainda descrito que hábitos tabágicos, a utilização nocturna das próteses e a má higiene destas, são factores que têm de ser tidos em conta na etiologia da estomatite protética (26,27).

Samaranayake L.P., destaca as bases das próteses acrílicas como um importante factor predisponente para a estomatite protética, já que estes aparelhos, em condições de higiene deficiente geralmente funcionam como reservatórios da infecção (28).

Torna-se, assim, importante perceber como é feita a colonização microbiana das próteses após a sua colocação na cavidade oral.

3.1.2 Colonização das próteses

As próteses acrílicas são um factor predisponente importante na alteração da microflora oral, estando descrito que a introdução de uma prótese removível na cavidade oral pode mudar significativamente este ecossistema (28).

Esta mudança pode ser quantitativa, aumentando a quantidade total de microrganismos orais, ou qualitativa, aumentando uma certa parte da microflora oral (28).

Acredita-se que a capacidade de determinadas espécies de *Candida*, especialmente *Candida albicans*, de aderir a superfícies de acrílico, pode ser importante na patogénese da estomatite protética, já que este mecanismo representa o passo inicial para a colonização microbiana e posterior invasão das superfícies do hospedeiro (28). É do conhecimento da comunidade científica que a adesão de *Candida*, sua colonização e o seu desenvolvimento em biofilme leva a muitas infecções orais, incluindo a estomatite protética (29,31). A formação de biofilmes de fungos é um fenómeno complexo e diverso, tendo a formação do biofilme da espécie

Candida albicans sido mais estudado que o das outras espécies deste género.

Está assim descrito, que o biofilme da espécie *Candida albicans* se desenvolve em três fases: i) adesão das células de levedura sobre a superfície da prótese (fase inicial); ii) formação de uma matriz de comutação dimórfica, de levedura para formas de hifas (fase intermediária), seguido de iii) aumento do material da matriz, originando uma arquitectura tridimensional (fase de maturação) (32,33,34).

Os biofilmes de *Candida* totalmente maduros têm uma mistura de morfologias que consistem numa rede densa de leveduras, hifas e pseudo-hifas agregadas numa matriz de polissacarídeos, hidratos de carbono, proteínas e componentes desconhecidos (32,33).

A formação e estrutura dos biofilmes de *Candida*, são influenciadas pela natureza da superfície de contacto, factores ambientais, morfologia da levedura e pelas espécies envolvidas (32).

Além da capacidade de adesão de *Candida albicans* às superfícies de acrílico, como foi atrás referido, esta é a espécie deste género que apresenta também maior capacidade de adesão às células epiteliais da mucosa oral, facto que está favorecido por diferentes factores inerentes ao próprio fungo, como a transição de blastoconídeo a hifa e a produção de diferentes enzimas extracelulares, como proteinases e fosfolipases e por

condições do micro ambiente oral tais como, temperatura, pH e concentração de hidratos de carbono (23,35).

Assim sendo, torna-se fundamental para o Médico Dentista diagnosticar uma estomatite protética e para tal necessita de saber quais as características clínicas desta patologia.

3.1.3. Características Clínicas

Uma vez que a estomatite protética é uma patologia com uma incidência bastante significativa nos pacientes portadores de próteses removíveis (36,37), Newton em 1962, criou uma classificação baseada nos aspectos clínicos das lesões, dividindo-as em três classes:

_ Classe I - Hiperemia puntiforme - é definida pela hiperemia dos ductos de glândulas salivares palatinas menores; o que confere aspecto eritematoso puntiforme, podendo ocupar áreas dispersas ou pequenas áreas localizadas no palato;

- Classe II - Hiperemia difusa - é apontada por muitos estudos como o tipo mais comumente encontrado. Apresenta mucosa lisa e atrófica, com aspecto eritematoso em toda a região sob a prótese;

- Classe III - Hiperemia granular - é frequentemente associada à câmara de sucção, acometendo a região central do palato com aparência clínica nodular e rugosa da mucosa.

No entanto, existem autores que optaram por uma classificação mais simples, classificando a estomatite protética como um processo inflamatório da mucosa oral, cujas principais formas clínicas são a atrófica e a hiperplásica (38), tendo Shafer em 1987 descrito que a Candidíase atrófica crónica é que pode ser equivalente à estomatite protética.

3.1.4. Diagnóstico

Para que o Médico Dentista efectue um correcto diagnóstico de uma estomatite protética deverá ter em conta alguns sinais clínicos: alteração da cor e textura da mucosa e a sintomatologia descrita pelo paciente. Para além dos sinais clínicos o Profissional de Saúde, para ser rigoroso, deverá recorrer a exames laboratoriais. Dentro dos exames laboratoriais um dos mais utilizados é a citopatologia. Este exame, consiste na obtenção de material através da raspagem da mucosa com uma espátula de madeira ou metal, ou escovilhão, para a colheita de células epiteliais superficiais e, passagem para uma lâmina de vidro com posterior fixação em álcool, e coloração com Papanicolau ou PAS (ácido periódico de Schiff) para observação em microscópico óptico. Deve-se realizar a citopatologia da lesão bucal e também uma colheita da prótese em questão, isto porque, evidências de positividade para estruturas de *Candida albicans* são bem superiores na prótese. Segundo Cawson (1995), o diagnóstico depende da demonstração de hifas de *Candida* no esfregaço, Como vantagens da citopatologia, podem-se citar: baixo custo, rapidez do resultado e facilidade de execução.

O Médico Dentista pode também recorrer ao teste terapêutico que consiste na prescrição de um antifúngico tópico, na ocorrência de sinais e sintomas compatíveis com a estomatite protética, aliado ao acompanhamento profissional. Quando há regressão da lesão após o tratamento, que varia de 7 a 14 dias, pode dizer-se que se estava perante uma estomatite protética.

Em 1983, Unerkircher, demonstrou que o isolamento de *Candida albicans* é um achado quase constante em casos de estomatite protética e que a pesquisa de anticorpos na saliva é importante para o diagnóstico da doença (39).

Para Budtz-Jorgensen (1990) dado que *Candida spp.* faz parte da colonização normal da cavidade oral é necessário realizar uma estimativa quantitativa da presença de leveduras sobre a superfície de contacto da prótese e sobre a mucosa subjacente, para assim ser possível estabelecer um diagnóstico de estomatite protética. Normalmente, culturas com 50-100 colónias de leveduras em agar Sabouraud a partir de colheitas da superfície da prótese indicam a presença de uma infecção por *Candida*, consequentemente a presença de uma estomatite protética (30). Como vantagem, este tipo de exame, tem o facto de ser rápido, económico e não implicar desconforto para o paciente.

3.1.5. Tratamento

Após um correcto diagnóstico de uma estomatite protética o Médico Dentista tem de instituir, ao paciente, um tratamento para esta patologia.

O tratamento de eleição para a estomatite protética, associada à Candidíase, consiste na combinação de um antifúngico tópico, orientação do paciente quanto à higienização da prótese e verificação da necessidade da troca da mesma, podendo ainda ser sugerido ao doente que evite o uso nocturno da prótese.

O Miconazol a 2% tem apresentado sucesso quando aplicado, em detrimento a outros antifúngicos por apresentar-se na forma de gel. O medicamento é acondicionado directamente à prótese, previamente higienizada, que funciona como uma “moldeira”, o que confere ao medicamento um maior tempo de contacto com a lesão, permitindo uma regressão mais rápida do quadro patológico. Esse procedimento de aplicação deve ser feito duas a três vezes ao dia com duração de uma a duas semanas (36,40).

Existem, no entanto, estudos que demonstram que a actividade dos antifúngicos do grupo dos Azois é fungistática e não fungicida (Batista 1996).

A Nistatina, por sua vez, sendo um antifúngico tópico muito utilizado para o tratamento de outros subtipos de Candidíase, parece não ter um efeito

tão satisfatório na estomatite protética quando comparado com o Miconazol gel, uma vez que se encontra sob a forma de suspensão, o que proporciona um menor tempo de contacto com os microrganismos, retardando o alcance do efeito desejado (36,41).

Quando não há melhoras clínicas após a aplicação de antifúngicos locais tem que se recorrer a antifúngicos sistémicos. O Fluconazol é um derivado do Triazol bem absorvido sistemicamente, que não necessita do meio ácido para potencializar a sua acção, mas que apresenta toxicidade hepática. Pode potencializar o efeito da Fenitoína e de agentes hipoglicemiantes. A posologia recomendada é de dose única e diária, devendo realizar-se uma dose de ataque de 400mg no primeiro dia, com doses diárias subsequentes de 100mg, durante uma a duas semanas (36, 42).

Durante muito tempo, foi utilizada a Anfotericina B como medicamento antifúngico de referência. No entanto, este fármaco acabou por ser abandonado para este tipo de tratamento devido à nefrotoxicidade e à necessidade de hospitalização. Após a descoberta de novos medicamentos mais seguros e menos deletérios, este acabou por ser abandonado.

Em 1980, Bergendal e Isacson observaram que o tratamento da estomatite protética com antifúngicos é ineficaz uma vez que após o fim do tratamento há uma nova colonização fúngica.

Em 1982 Watson e tal., consideraram o uso de Nistatina e Anfotericina B satisfatórios, no entanto, admitem que alguns casos de estomatite protética não respondem a estes fármacos.

Existem autores que afirmam que o uso de antifúngicos não é necessário em certos casos, onde somente o rebasamento, a adaptação da prótese, o uso adequado e higiene perfeita da mesma, propicia o desaparecimento da área eritematosa trazendo alívio ao paciente (43).

No entanto, existe um estudo de Kulak (1994) que não corrobora com estes autores. Neste estudo os pacientes com evidência clínica da doença foram divididos em três grupos: o primeiro foi tratado com Fluconazol por duas semanas, o segundo foi instruído a aplicar solução de Clorexidina na superfície interna da prótese duas vezes ao dia, em adição ao tratamento com Fluconazol por duas semanas. Para o terceiro grupo foram apenas confeccionadas próteses novas. Os melhores resultados foram entre aqueles cujo tratamento se associou Clorexidina ao Fluconazol.

Pacientes com estomatite protética generalizada na cavidade oral não apresentam melhoras com a confecção de novas próteses sem medicação. Isso só ocorreu quando as estomatites eram localizadas (44).

Tendo em conta tudo o que foi descrito pelos diferentes autores podemos concluir que a maioria dos casos de estomatite protética tratam-se com antifúngicos, no entanto a taxa de recidiva é alta e as infecções tendem a

espalhar-se para outras zonas da mucosa oral. Assim, o importante é tomarem-se medidas preventivas para reduzir a colonização da mucosa palatina e das próteses por leveduras e bactérias. As mais importantes são escovar as próteses e não as usar durante a noite mantendo-as secas (45).

3.2. Métodos de Higienização das Próteses

Após a colocação das próteses, a orientação de uso, a higiene e acompanhamento periódico são necessárias para garantir as condições funcionais sem trazer problemas para os tecidos de suporte (46).

O acompanhamento da eficiência da higiene da prótese geralmente é realizado clinicamente pela observação visual, que tem a desvantagem de nem sempre dizer o real estado de higiene, das próteses, realizada em casa, e por outro lado, as possíveis consequências só são vistas após um período de tempo mais longo.

A higiene das próteses é de extrema importância na prevenção de danos causados por estes aparelhos.

O método mais comum para a remoção da placa na prótese é a escovagem com pasta abrasiva – método mecânico (47).

O método mecânico é o mais popular para remover a placa das próteses mediante o uso de escovas e pastas dentífricas, no entanto, existe

evidência que utilizar só este método não é suficiente para eliminar a placa bacteriana das bases das próteses pelo que há que combina-lo com o uso de desinfectantes (48).

Outra desvantagem que este método apresenta é que se são usados de forma exagerada e com técnica incorrecta podem causar danos nas próteses, tendo efeitos como manchas persistentes e distorção dos ganchos, afectando a sua capacidade retentiva. São igualmente ineficazes em pacientes com limitação motora, já que a remoção efectiva da placa bacteriana requer um certo grau de destreza manual. No entanto tem a vantagem de ser de uso simples e económico (48,49).

O método químico é o segundo método mais popular, para a limpeza de próteses, sendo superior ao mecânico relativamente ao controlo de placa bacteriana e prevenção de estomatite protética associada a *Candida albicans* (49,50).

È bem conhecida a necessidade de remoção de placa bacteriana das próteses para a manutenção da saúde dos tecidos de suporte. Tendo ainda como benefício, de uma boa higiene, a prevenção da formação de manchas extrínsecas e halitose (29,51). Estudos recentes sugerem que uma limpeza química é mais eficaz que uma limpeza mecânica para a prevenção do aparecimento de *Candida albicans* associada à estomatite protética (47,52, 53).

O produto de limpeza ideal deve ser eficaz na remoção de manchas, eliminação de depósitos orgânicos e inorgânicos e deve ser bactericida e fungicida. No entanto devem também ser compatíveis com o material da prótese e não devem ser tóxicos. Devem ainda ser de fácil utilização por parte do paciente, mesmo por aqueles que apresentam limitações motoras e não muito dispendioso economicamente (53).

Pela revisão dos trabalhos de Banting e tal 1995; Catão e tal. 2005 e Cruz e tal. 2005 concluiu-se que a clorexidina, as substâncias antifúngicas e o hipoclorito são os agentes químicos mais utilizados. Mas o que se deve frisar é que a escovagem da prótese é o primeiro passo para a limpeza eficaz (54,55,56).

3.3. Mecanismos de acção dos antifúngicos

Os fungos encontram-se bastante disseminados na natureza. Certas espécies podem provocar doenças no Homem denominadas micoses. As células fúngicas são eucarióticas e, como tal, são bastante mais semelhantes às células humanas do que as células bacterianas. Os fármacos antifúngicos deverão ter uma toxicidade selectiva sobre as células dos fungos, poupando as células do hospedeiro (57).

Nos últimos 20 anos, ocorreram várias mudanças no sentido de aumentar o espectro e eficácia dos fármacos destinados ao tratamento das infecções produzidas por fungos.

As opções de tratamento variam desde agentes poliênicos de aplicação tópica de utilização até quatro vezes por dia, até aos agentes azólicos de administração sistémica semanal que vão desde dose única da droga (Fluconazol) até dose única diária durante uma semana (Itraconazol).

Relativamente poucas drogas antifúngicas estão disponíveis, quando comparado com a gama de antibióticos que têm sido produzidos, o que provavelmente reflecte o reconhecimento relativamente recente da importância das infecções fúngicas em seres humanos e as dificuldades envolvidas no desenvolvimento de um agente com actividade contra um tipo de célula eucariótica, sem problemas de toxicidade associados à célula hospedeira.

As drogas antifúngicas são classificadas de acordo com o seu modo de acção: i) Destruição das membranas das células fúngicas, como acontece com os antifúngicos Poliênicos (Nistatina e Anfotericina), ii) Inibição da síntese de ergosterol, exemplificado pelo grupo dos Azóis (Fluconazol e Itraconazol), iii) Inibição da síntese β -1,3-D-Glucano (antifúngico Equinocandina), e iv) Indução da síntese incorrecta de RNA e interferência na replicação do DNA (5 - Fluorocitosina).

Os antifúngicos Poliênicos exercem a sua actividade fungicida induzindo a porosidade da membrana celular após interacção com o componente ergosterol da membrana, com o subsequente efeito de perda de conteúdo citoplasmático. Os Polienos têm um amplo espectro de actividade

antifúngica, mas, devido à sua má absorção intestinal, a sua utilização no tratamento de Candidose oral é extremamente limitada. No entanto, pelo facto destes agentes não serem absorvidos, aumenta o seu perfil de segurança. Apesar de terem sido amplamente utilizados durante várias décadas, a actual incidência da resistência de *Candida* aos Polienos é rara, mas por vezes pode surgir devido a uma redução no teor de ergosterol das membranas celulares.

A eficácia clínica dos agentes que só podem ser utilizados topicamente, tal como a Nistatina, é limitada devido à dificuldade em manter níveis adequados da droga no local da infecção. O sabor dos agentes tópicos estimula a secreção salivar, que rapidamente dilui e remove o agente antifungico da boca, o que limita a sua utilização clínica.

Os antifúngicos Azólicos têm uma acção fungistática interferindo com a enzima Demetilase lanosterol que é uma enzima chave na biossíntese do ergosterol.

Tanto o Fluconazol como o Itraconazol são bem absorvidos pelo intestino, o que significa que a administração oral é um meio eficaz de actuação sistémica.

Além disso, os efeitos do Fluconazol na cavidade oral são reforçados por ser segregado na saliva em níveis equivalentes aos obtidos no sangue. O Fluconazol é o agente de primeira escolha para todas as formas de Candidose oral, à excepção da Candidose Eritematosa Crónica.

O Fluconazol tem um bom perfil de segurança quando administrado sistemicamente, com poucas contra-indicações ou efeitos colaterais apresentando no entanto interações importantes com anticoagulantes cumarínicos e agentes antidiabéticos.

A resistência adquirida aos antifúngicos Azólicos tem emergido nos últimos anos, e certas espécies de *Candida* também são inerentemente resistentes a estes agentes.

Vários mecanismos de resistência aos Azólicos têm sido relatados, incluindo alterações na estrutura química da enzima demetilase, a remoção do Azol da célula por bombas transportadoras, e a compensação por outras enzimas intervenientes na síntese de esteróis na biosíntese da membrana.

Mesmo na ausência de um mecanismo de resistência conhecido, a susceptibilidade *in vitro* de uma determinada estirpe de *Candida* muitas vezes não se correlaciona com o resultado clínico em pacientes com Candidose Oral.

Uma possível explicação para este facto pode estar relacionada com as diferenças fenotípicas existentes entre células de culturas planctónicas e de biofilme sendo a forma planctónica a que é mais frequentemente utilizada para os testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos (58).

3.4.Óleos essenciais – Aldeído Cinamónico

Há muitos anos que os produtos de origem natural são utilizados no mundo inteiro como terapêutica alternativa. Estima-se que as comunidades locais utilizam cerca de 10% das plantas nativas com fins terapêuticos. No entanto apenas 1% dos produtos utilizados ganha reconhecimento científico (59).

Sartorato et al. (2004) destacam que o uso de plantas medicinais é uma prática rotineira nos países em desenvolvimento, especialmente na África, Ásia e América Latina, onde existe uma necessidade de utilização da medicina popular com solução alternativa para problemas de saúde (60).

Considerando a perspectiva de obtenção de novos fármacos, os produtos naturais diferenciam-se dos sintéticos sob o aspecto da diversidade molecular. Sabe-se que a diversidade molecular dos produtos de origem natural é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, é ainda limitada. Isso proporciona a elaboração de diversos novos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (61).

Alguns extractos de plantas e metabólitos secundários possuem efeitos inibitórios letais e dose-dependentes sobre diferentes microrganismos (62).

Das substâncias extraídas devem-se realçar os óleos voláteis, que na sua maioria evidencia forte actividade antibacteriana e antifúngica, atribuídas à presença de monoterpenos, que representam cerca de 90% dos compostos presentes (63, 64).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos organismos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (Siqui et al., 2000). Foi provado cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (65, 66).

Se tivermos em conta que nenhum dos tratamentos existentes para a estomatite protética é 100% eficaz torna-se pertinente estudar outras formas de actuação perante esta patologia.

Após a análise da constituição do Mycostatin® (medicamento usado no tratamento da estomatite protética) verificamos que um dos seus constituintes é o Aldeído Cinamónico - óleo essencial de canela.

Um dos efeitos mais estudado deste óleo é a sua acção espasmolítica e anti-inflamatória (Alonso 1998; Vanaclocha e col., 2003). Também está descrita uma acção antibacteriana e antifúngica. A acção antifúngica manifesta-se em relação à inibição do desenvolvimento de vários dermatófitos e leveduras, inibindo, paralelamente, a produção de micotoxinas (67, 68, 69, 70,71,72).

4. Materiais e Métodos

4 Materiais e Métodos

4.1. Ensaio preliminar

Com este ensaio preliminar pretendemos avaliar a susceptibilidade de quatro agentes químicos sobre uma estirpe de *Candida albicans* (ATCC 26278) de modo a seleccionar os dois que obtivessem melhores resultados para serem usados no estudo experimental.

4.1.1. Preparação dos agentes antifúngicos

Neste estudo foram utilizados 3 agentes antifúngicos: Nistatina, Fluconazol e Mycostantin® e um óleo essencial – Aldeído Cinamónico (Extracto de *Cinnamomum Zeylanicum*).

A suspensão de Nistatina foi preparada a partir da Nistatina e de *Jarabe simple* (Fagron Ibérica S.A.U Barcelona) numa concentração de 100.000UI/ml ou seja 18,39mg/ml. Esta suspensão foi conservada ao abrigo da luz a uma temperatura de 2-8°C e após abertura do recipiente foi armazenada a 25°C e consumida no prazo de 7 dias (Martindale, 1999).

A suspensão de Fluconazol foi realizada com a mesma concentração da Nistatina (18.39mg/ml), fazendo uma diluição em água destilada estéril, do Diflucan® (Pfizer) em pó (40mg/ml), tendo sido conservada a 25°C e consumida no prazo de 7 dias.

O Mycostantin® (Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa, S.A.) foi utilizado numa concentração de 100.000UI/ml, conservado a 25°C e consumido no prazo de 7 dias.

O Aldeído Cinamónico (Extracto de *Cinnamomum Zeylanicum* Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Portuguesa, S.A.) foi utilizado num período de 7 dias após abertura e conservado durante este tempo, protegido de luz a uma temperatura de 25°C.

4.1.2. Teste de susceptibilidade de *Candida albicans* aos agentes

No primeiro dia foi semeada uma estirpe de *Candida albicans* (ATCC 26278) em Agar Sabouraud com Cloranfenicol que foi em seguida incubada a 37°C durante 24 horas. Ao fim deste tempo foi realizada uma suspensão de *Candida albicans* em 1000µl de água destilada estéril com uma concentração de 0.5 na escala de Mc Farland (fig 1).



Fig. 1 - Suspensão de *Candida* ATCC (26278) com uma concentração de 0,5 na escala de Mc Farland

Seguidamente, com uma zaragatoa estéril embebida na suspensão preparada, foram semeadas 12 placas de agar Muller Hinton (fig 2) para a realização dos testes de susceptibilidade a cada um dos agentes químicos em triplicado.



Fig. 2 - Sementeira da suspensão de *Candida* ATCC(26278) nas placas de agar Muller Hinton

Posteriormente, colocou-se no centro de cada placa, um disco de papel de filtro estéril embebido na substância a testar, respectivamente, (Fluconazol, Mycostatin®, Nistatina e Aldeído Cinamónico) – este procedimento foi realizado em triplicado (fig 3 e 4).



Fig. 3 – Discos de papel de filtro estéreis a serem embebidos nas substâncias a testar

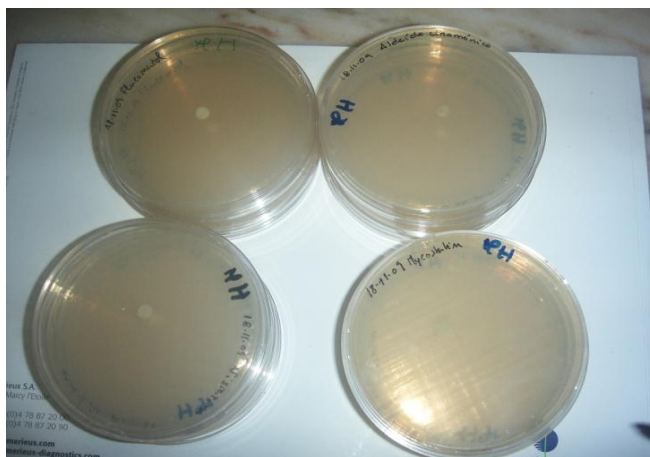


Fig. 4 - Discos de papel de filtro embebidos nas substâncias a testar colocados no centro de cada placa.

Ao fim de 24 horas de incubação das placas na estufa a 37°C, foram feitas as medições dos halos de inibição, com régua milimétrica em dois planos (vertical e longitudinal) a passarem pelo centro do disco.

4.2. Estudo experimental

Após os ensaios preliminares foi verificado que os agentes que apresentavam maior halo de inibição foram o Fluconazol e o Aldeído Cinamônico, pelo que no estudo experimental foram testados apenas estes dois agentes nas espécies de *Candida* que foram isoladas das próteses dos Pacientes de estudo.

4.2.1. Caracterização da amostra

Neste estudo participaram 30 Pacientes da consulta de Reabilitação Oral da Unidade Clínica de Gandra no Instituto Superior de Ciências da Saúde

– Norte, aos quais foi explicado o objectivo do estudo, tendo aceitado e assinado o consentimento informado.

De todos os Pacientes foram realizadas colheitas nas próteses superiores, com vista ao isolamento de *Candida*. Os casos que foram negativos para *Candida* foram retirados do estudo pelo que não se apresentam aqui os seus dados.

Assim, a amostra de estudo ficou reduzida a 20 Pacientes, sendo 10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino com idades compreendidas entre 26 e 81 anos (média 58,0 anos). Os pacientes foram avaliados relativamente ao tipo de prótese que usavam, tempo de colocação, higiene, adaptação e presença ou ausência de estomatite protética.

4.2.2. Colheitas

Com uma zaragatoa embebida em água destilada estéril foram realizadas colheitas nas próteses acrílicas e esqueléticas superiores, esfregando vigorosamente na superfície que fica em contacto com o palato com zaragatoa humedecida em água destilada estéril. As amostras colhidas foram processadas no laboratório com um intervalo máximo de uma hora.

4.2.3. Processamento das amostras

Cada amostra foi semeada com ansa estéril pelo método de estria por esgotamento para isolamento de colónias em Agar Sabouraud com Cloranfenicol (Oxöid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom), tendo sido seguidamente incubadas em estufa a 37°C, 24 a 48 horas.

Todas as culturas foram conservadas no frigorífico a 4°C até à obtenção de todas as amostras para identificação das espécies e realização dos testes de susceptibilidade.

4.2.4. Pré-identificação das espécies de *Candida* em meio ChromID agar

As 20 espécies de *Candida* isoladas das próteses foram retiradas do frigorífico para serem repicadas em agar Sabouraud com cloranfenicol e em seguida pré-identificadas em meio cromogénico chromID™ *Candida* (BioMérieux – Marcy – l'Étoile France). Assim, cada placa do meio cromogénico foi dividida em 4 quadrantes e em cada quadrante foram inoculadas uma a duas colónias de cada espécie isolada. Todas as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

As colónias de cor azul, foram pré-identificadas como *Candida albicans* (hidrólise específica do substrato cromogénico hexosaminidase). As

colónias que apresentavam uma cor azul e uma coloração rosa foram assumidas como culturas mistas e as colónias de cor branca foram pré-identificadas como *Candida krusei* (fig.5)



Fig. 5 - Guia de identificação do meio cromogénico da BioMérieux.

4.2.5. Identificação das espécies de *Candida* com galeria ID32 C

As galerias ID32C (BioMérieux – Marcy – l'Étoile France), são um sistema estandardizado para identificação de leveduras, compreendendo 32 testes de assimilação miniaturizados.

Assim, de um modo aleatório, foram seleccionadas algumas das espécies pré-identificadas com o meio ChromID para confirmação de identificação por este método.

Foram retiradas uma a duas colónias do meio Agar Sabouraud com Cloranfenicol e colocadas no meio de suspensão API com uma densidade de inóculo equivalente a 2 na Escala de Mc Farland medida com o densitómetro ATB™ (BioMérieux – Marcy – l'Étoile France) Desta suspensão foram retirados 250µl para o meio API C e daí foram retirados 135µl para cada cúpula da galeria.

Todas as galerias foram incubadas a 29°C ± 2°C durante 24-48 horas. As leituras visuais foram realizadas, tendo sido considerados positivos os testes cujas cúpulas se apresentavam turvas. Os resultados foram anotados nas respectivas fichas. O perfil numérico permitiu a identificação da espécie com o auxílio do catálogo analítico ID32C (BioMérieux – Marcy – l'Étoile France).

4.2.6. Testes de susceptibilidade das espécies de *Candida* pelo método de difusão em agar:

Para a realização dos testes de susceptibilidade foram realizadas suspensões das 20 espécies de *Candida* em fase de crescimento logarítmico, em 1000µl de água destilada estéril com uma densidade óptica de 0,5 da escala de Mc Farland equivalente a 3x10⁸ UFC/ml.

Com uma zaragatoa estéril embebida na suspensão foram semeadas 6 placas por espécie, em Agar Muller Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom)

Em três dessas placas foi colocado um disco de papel de filtro estéril embebido em Aldeído Cinamónico e nas outras três foi colocado um disco de papel de filtro embebido numa solução de Fluconazol. Os meios foram incubados a 37°C durante 24 horas.

4.2.7. Leitura dos testes de susceptibilidade

Decorrido o período de incubação, as medições dos halos de inibição foram realizadas, com régua milimétrica, em dois planos (transversal e longitudinal) a passarem pelo centro do disco. Estas medições foram realizadas sempre pelo mesmo examinador utilizando uma boa fonte de luz reflectida.

5.Resultados

5 Resultados

5.1. Resultados do estudo preliminar

Como se pode verificar pela observação das figuras 6, 7, 8 e 9, o agente químico que apresentou um maior halo de inibição de crescimento de *Candida* ATCC (26278) foi o Fluconazol e o que produziu menor halo foi o Mycostatin®.

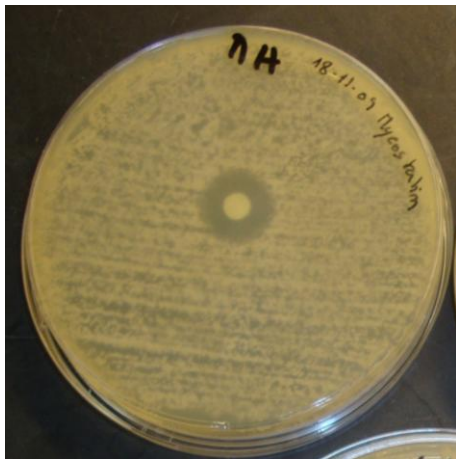


Fig. 6 – Halo de inibição do Mycostatin®



Fig. 7 - Halo de inibição da Nistatina

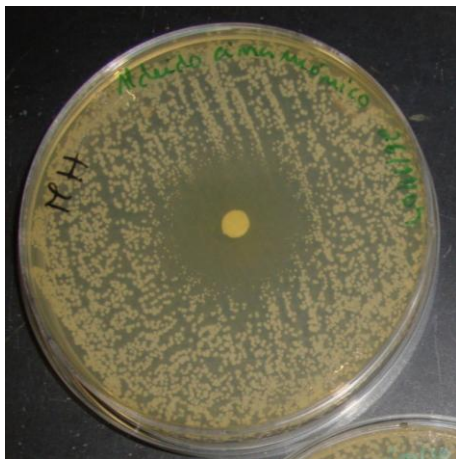


Fig. 8 - Halo de inibição do Aldeído Cinamônico



Fig. 9 - Halo de inibição do Fluconazol

Tal como foi referido em material e métodos, este ensaio preliminar foi realizado em triplicado e as medições dos halos de inibição foram realizadas transversal e longitudinalmente, pelo que nas tabelas 1 e 2, apresentam-se os resultados destas medições, a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação

Agentes químicos	Unidade: mm								
	Candida ATCC			Candida ATCC			Candida ATCC		
	Transversal (mm)	Longitudinal (mm)	Área (mm ²)	Transversal (mm)	Longitudinal (mm)	Área (mm ²)	Transversal (mm)	Longitudinal (mm)	Área (mm ²)
Fluconazol	38,00	40,00	1.520,00	38,50	40,00	1.540,00	38,00	41,00	1.558,00
Aldeído Cinamónico	31,50	33,00	1.039,50	34,00	36,00	1.224,00	31,00	33,00	1.023,00
Mycostantin	17,00	19,00	323,00	15,00	19,00	285,00	17,50	22,00	385,00
Nistatina	24,00	23,00	552,00	21,00	20,50	430,50	24,00	23,00	552,00

Tabela 1 - Resultados dos halos de inibição dos 4 agentes testados realizados em triplicado e obtido por medição transversal e longitudinal.

Agentes químicos	Média			Desvio Padrão			Coeficiente de Variação		
	Transversal	Longitudinal	Área (mm ²)	Transversal	Longitudinal	Área (mm ²)	Transversal	Longitudinal	Área (mm ²)
Fluconazol	38,17	40,33	1.539,33	0,29	0,58	19,01	0,76%	1,43%	1,23%
Aldeído Cinamónico	32,17	34,00	1.095,50	1,61	1,73	111,59	5,00%	5,09%	10,19%
Mycostantin	16,50	20,00	331,00	1,32	1,73	50,48	8,02%	8,66%	15,25%
Nistatina	23,00	22,17	511,50	1,73	1,44	70,15	7,53%	6,51%	13,71%

Tabela 2 - Média, desvio padrão e coeficiente de variação da medição transversal e longitudinal dos halos de inibição dos 4 agentes

Para poder calcular a percentagem segundo a qual um agente químico é superior a outro na inibição de crescimento de *Candida* ATCC (26278), os diâmetros dos halos de inibição foram transformados em área. Desta análise, verifica-se que a superioridade do Fluconazol na inibição de crescimento de *Candida* ATCC (26278) frente aos outros agentes químicos testados é de 41% face ao Aldeído Cinamónico, de 201% face à Nistatina e 365% (3 vezes superior) face ao Mycostatin®. O Aldeído Cinamónico é o segundo fármaco com maior poder de inibição, sendo de 231% face ao Mycostatin® e de 114% face à Nistatina (tabela 3).

Área	Fluconazol	Aldeído Cinamónico	Mycostantin	Nistatina
Fluconazol	0	41%	365%	201%
Aldeído Cinamónico		0	231%	114%
Mycostantin			0	-35%
Nistatina				0

Tabela 3 - Percentagens de superioridade do fluconazol relativamente aos outros agentes químicos.

Assim, os fármacos que apresentaram maior estabilidade comportamental e que originaram uma maior área de inibição foram o Fluconazol e o Aldeído Cinamónico.

5.2. Resultados do estudo experimental

5.2.1. Dados dos pacientes

Foram avaliados neste estudo 20 indivíduos portadores de próteses removíveis.

A média de idades é de 58,0 anos com desvio padrão de 16,56565883, com um mínimo de 26 anos e um máximo de 81anos.

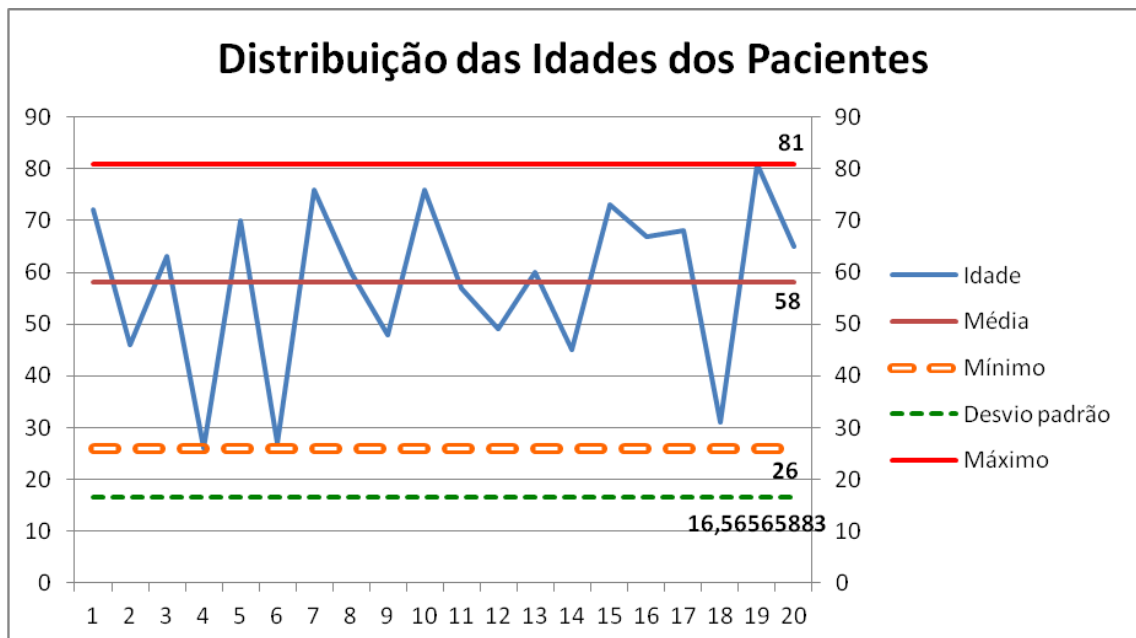


Gráfico - 1 Distribuição das idades dos pacientes

Quando avaliamos o sexo dos pacientes constituintes da amostra verificamos que 50% são do sexo feminino e 50% do sexo masculino, como se pode verificar pela observação do gráfico 2.



Gráfico - 2 Distribuição segundo o sexo

A distribuição da amostra global, segundo a idade encontra-se representada no gráfico 3.

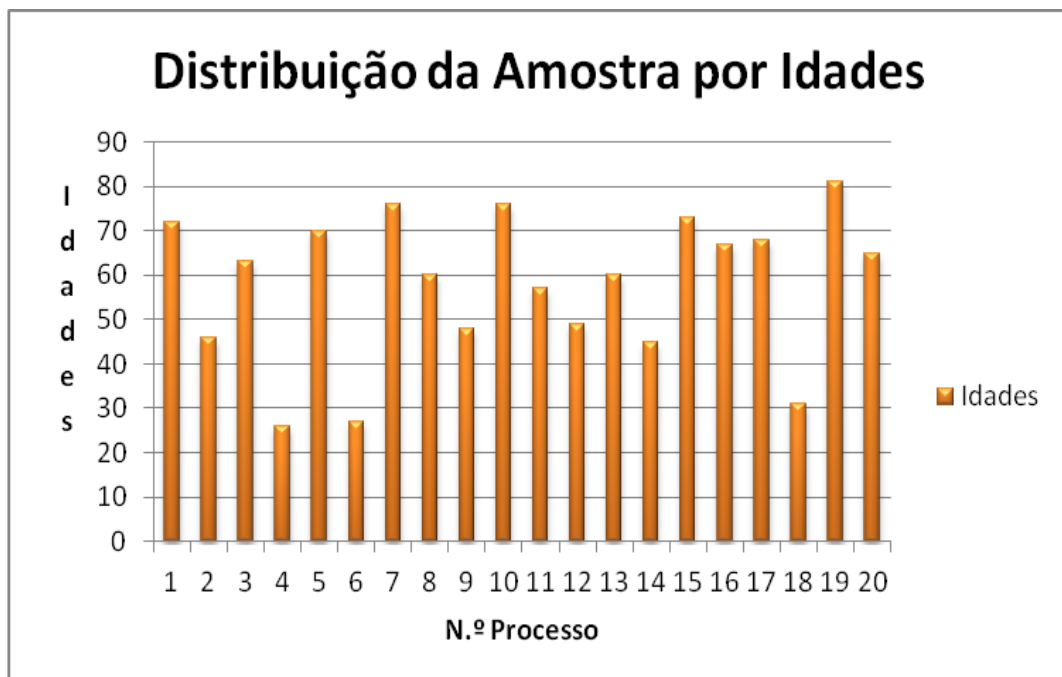


Gráfico - 3 Distribuição da Amostra por Idades

Os pacientes analisados, usavam prótese em média há 14,08 anos, sendo que uma média de 80% apresentava sinais de estomatite protética (gráfico 4)

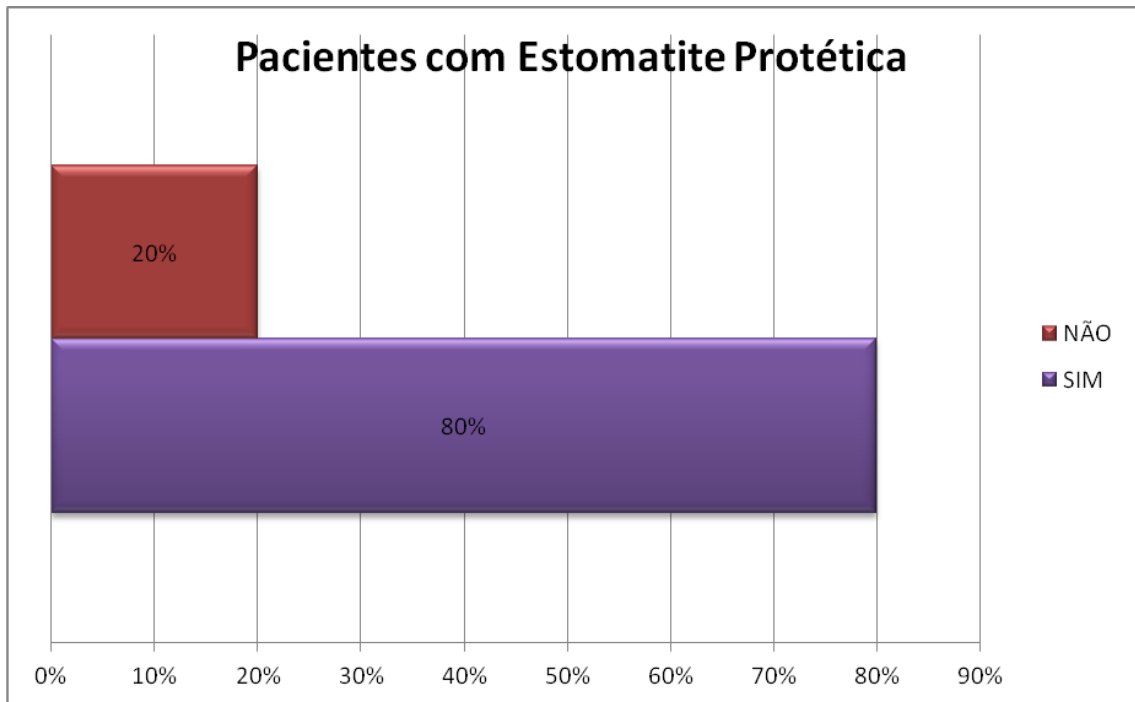


Gráfico - 4 Pacientes com estomatite protética

Verificamos, ainda, que 87,5% dos pacientes com Estomatite Protética apresentavam próteses mal adaptadas e que apenas 12,5% dos pacientes com Estomatite Protética apresentavam próteses bem adaptadas como se pode constatar no gráfico 5.

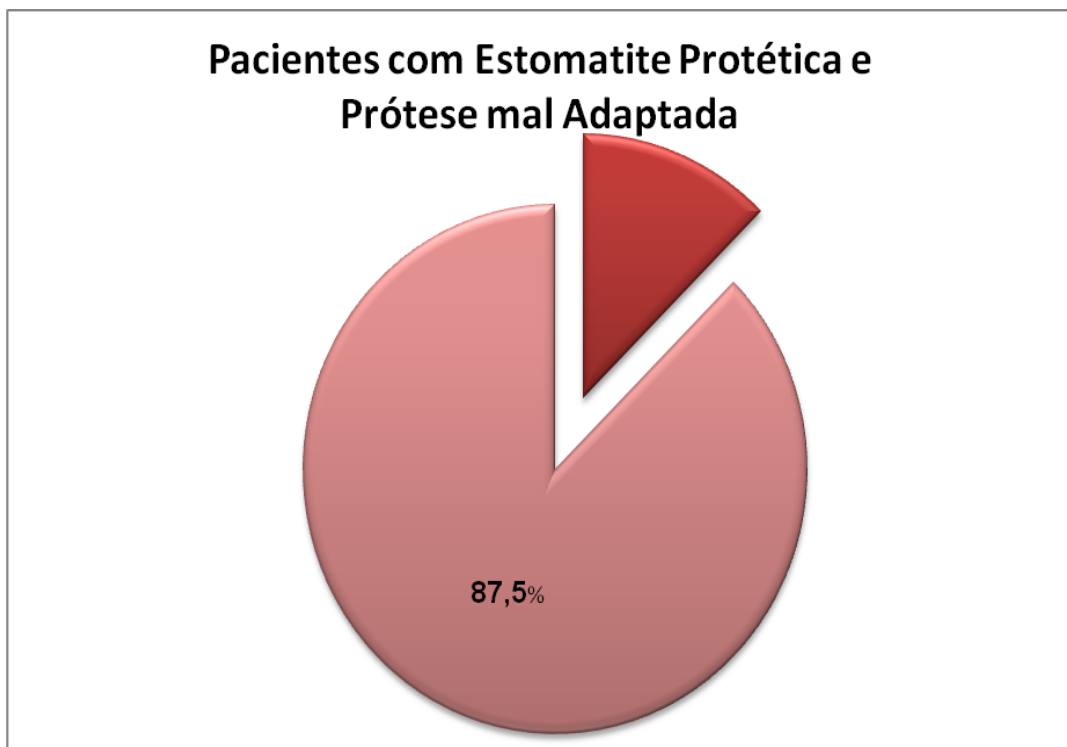


Gráfico - 5 Pacientes com estomatite protética e prótese mal adaptada

Ao analisarmos a nossa amostra verificamos que apenas 2 dos pacientes apresentavam estomatite protética e prótese bem adaptada como se pode verificar com a análise do gráfico 6.

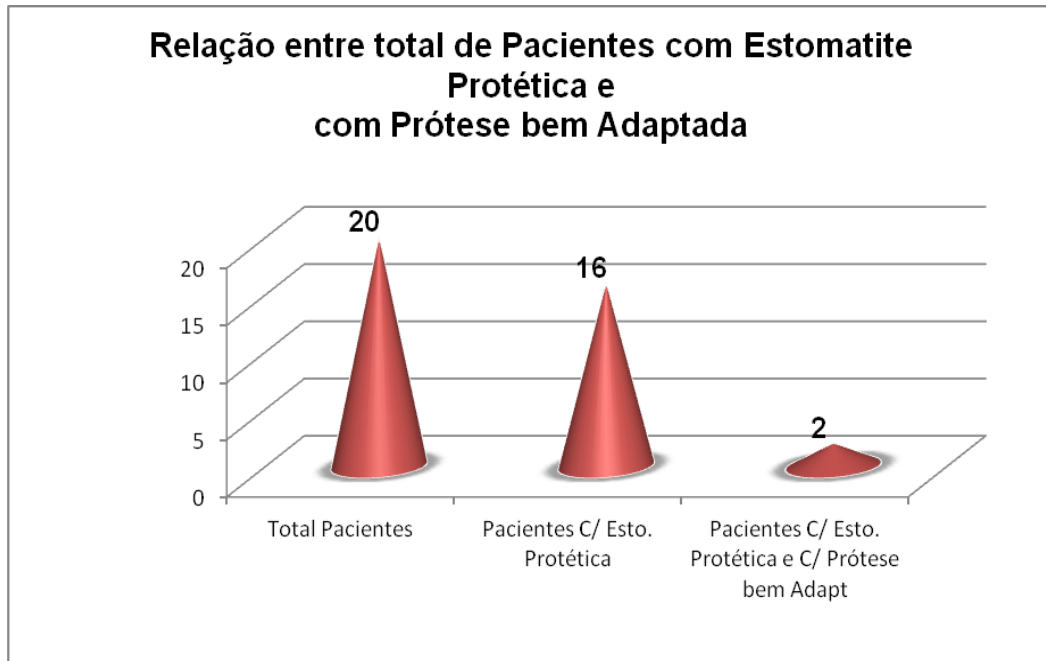


Gráfico - 6 Relação entre o total de pacientes com estomatite protética e com prótese bem adaptada

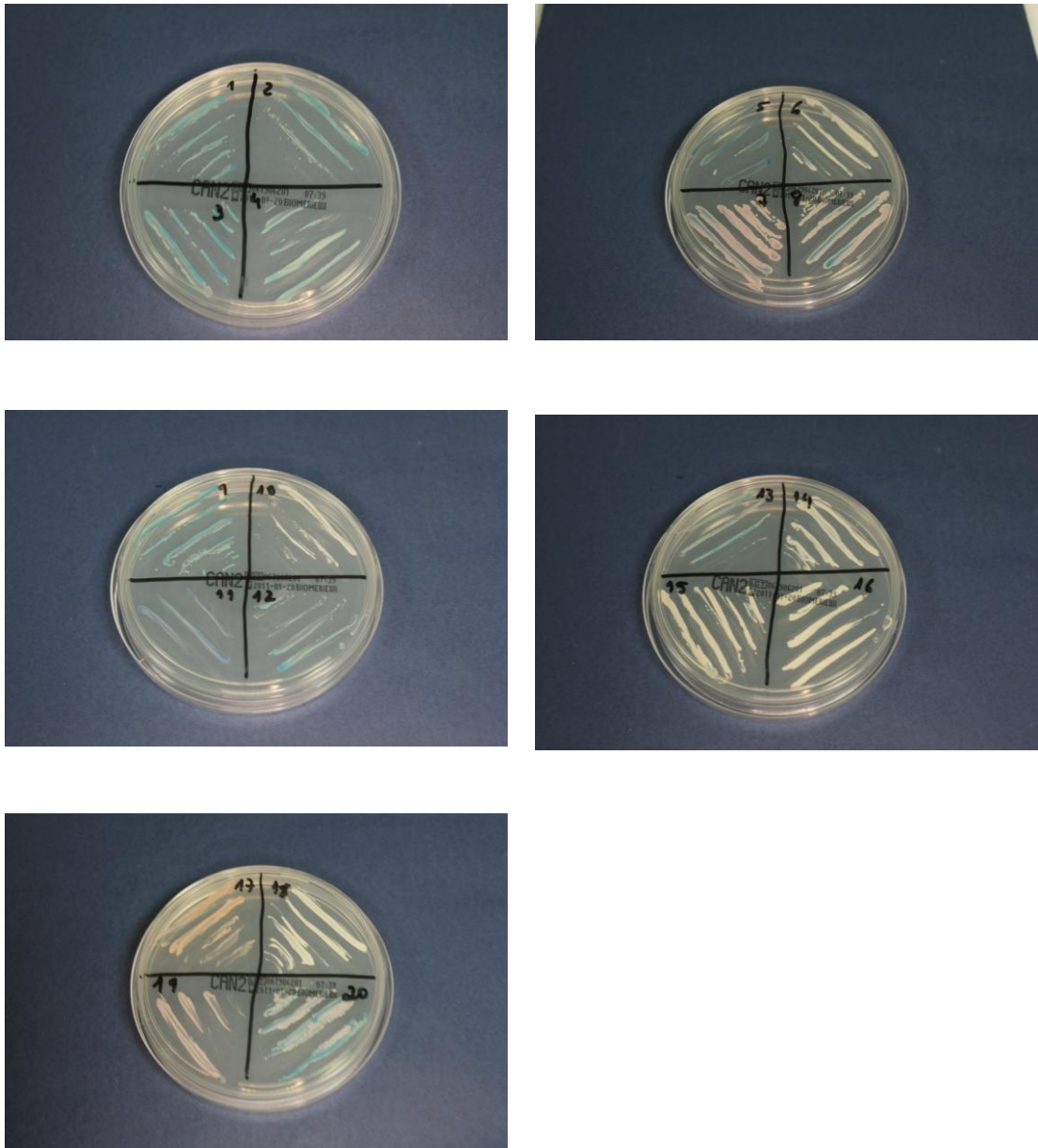
5.3. Resultados da identificação das espécies de *Candida*

Neste estudo, utilizou-se o meio cromogénico para pré-identificação das leveduras isoladas das próteses dos pacientes. Assim todas as colónias que cresceram com cores azuis foram pré-identificadas como *Candida albicans*. As outras colónias que apresentavam cor diferente, nomeadamente mistura de colónias azuis e rosa, colónias rosas e colónias brancas, foram assumidas como *Candida spp.* Para identificação final das espécies usaram-se galerias ID32C

Amostra	Cor das colónias em meio chromAgar	Pré identificação das colónias no meio chrom Agar	Identificação com galerias ID32C
1	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
2	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
3	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
4	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
5	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
6	Branca	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
7	Azul e rosa	<i>Candida spp</i>	<i>C.tropicalis</i> + <i>C.intermedia</i>
8	Azul e rosa	<i>Candida spp</i>	<i>C.tropicalis</i> + <i>C.intermedia</i>
9	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
10	Branca	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
11	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
12	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
13	Azul	<i>C albicans</i>	<i>C albicans</i>
14	Branca	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
15	Branca	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
16	Branca	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
17	Salmão	<i>Candida spp</i>	<i>C.holmi</i>
18	Branca	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
19	Rosa	<i>Candida spp</i>	<i>C glabrata</i>
20	Azul e rosa	<i>Candida spp</i>	<i>C.tropicalis</i> + <i>C.intermedia</i>

Tabela 4 - Resultados da identificação das espécies de *Candida*

5.3.1. Resultados do meio ChromID agar



5.3.2. Resultados da identificação com galerias ID32C



5.4. Resultados dos testes de susceptibilidade pelo método de difusão

Tendo em conta os resultados do ensaio experimental podemos concluir que nas 20 amostras testadas o Aldeído Cinamónico apresenta uma maior área de inibição com uma variação no comportamento significativamente reduzida. Podemos, ainda, concluir que o Fluconazol apenas teve efeito em 3 das 20 amostras demonstrando haver resistência a este fármaco por parte de 17 amostras testadas. Daqui concluímos que o fármaco com melhores resultados é o Aldeído Cinamónico (tabelas 4 e 5).

5.4.1. Resultados quantitativos- Aldeído Cinamónico

Processo	Transversal			Longitudinal		
1	20,25mm	22,27mm	23,55mm	20,27mm	23,46mm	23,53mm
2	23,01mm	21,19mm	22,69mm	23,01mm	21,13mm	24,32mm
3	26,75mm	26,46mm	25,41mm	25,11mm	25,81mm	24,37mm
4	23,35mm	21,81mm	23,56mm	22,28mm	22,10mm	23,58mm
5	22,96mm	24,50mm	22,38mm	22,24mm	24,49mm	23,41mm
6	26,20mm	25,26mm	25,62mm	25,26mm	25,62mm	26,73mm
7	22,78mm	22,77mm	23,16mm	22,25mm	22,76mm	23,36mm
8	21,72mm	20,07mm	21,61mm	20,66mm	21,60mm	22,18mm
9	23,29mm	23,71mm	23,41mm	23,28mm	29,04mm	22,95mm
10	23,99mm	25,98mm	23,56mm	25,98mm	25,47mm	24,33mm
11	23,52mm	23,49mm	22,99mm	24,73mm	22,76mm	24,79mm
12	28,44mm	27,53mm	28,86mm	28,89mm	26,54mm	28,08mm
13	25,14mm	24,27mm	25,80mm	26,41mm	24,26mm	24,50mm
14	22,36mm	22,36mm	25,08mm	22,35mm	23,48mm	23,76mm
15	29,81mm	30,27mm	34,13mm	28,57mm	30,28mm	33,21mm
16	28,31mm	27,54mm	29,57mm	28,70mm	26,11mm	29,72mm
17	24,59mm	22,55mm	26,01mm	24,14mm	21,76mm	26,46mm
18	25,60mm	24,28mm	27,99mm	24,27mm	25,38mm	28,59mm
19	28,37mm	28,09mm	27,05mm	28,10mm	28,10mm	28,00mm
20	22,00mm	22,07mm	21,09mm	20,18mm	21,19mm	22,09mm

Tabela 5 - Resultados do Aldeído Cinamónico

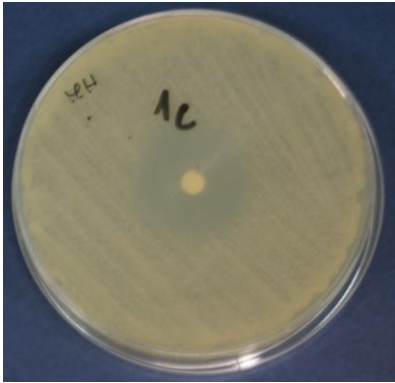
5.4.2. Resultados quantitativos - Fluconazol

Processo	Transversal			Longitudinal		
1	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
2	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
3	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
4	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
5	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
6	17,86mm	25,42mm	20,73mm	17,86mm	25,41mm	21,27mm
7	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
8	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
9	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
10	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
11	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
12	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
13	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
14	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
15	34,32mm	37,12mm	35,84mm	33,71mm	36,78mm	35,42mm
16	43,18mm	42,61mm	40,41mm	44,32mm	51,69mm	42,09mm
17	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
18	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
19	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
20	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm

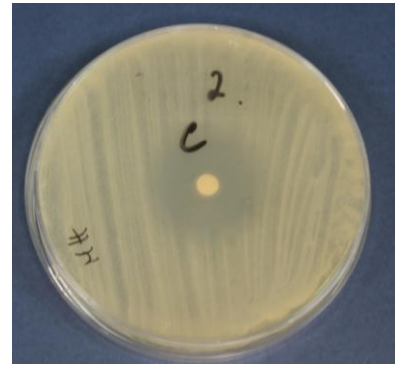
Tabela 6 - Resultados do Fluconazol

5.4.3. Resultados cualitativos - Aldeído Cinamónico

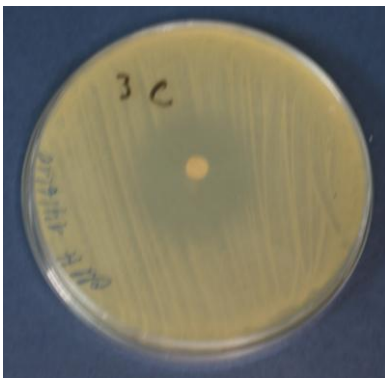
A



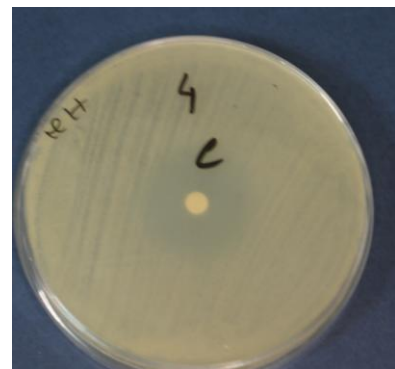
B



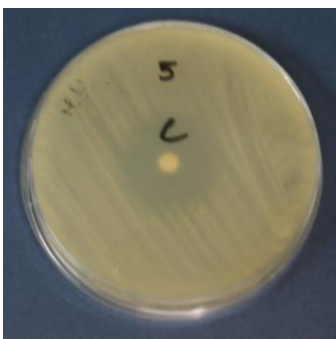
C



D



E



F



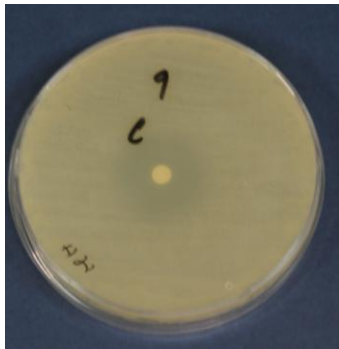
G



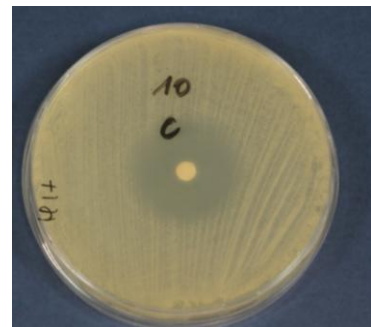
H



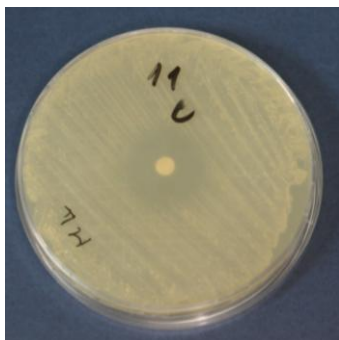
I



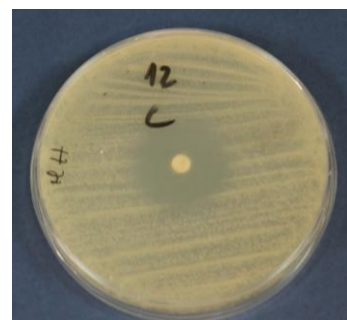
J



K



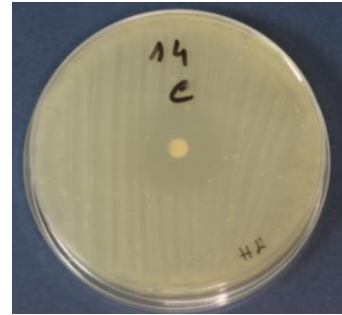
L



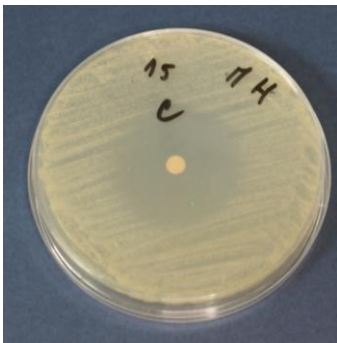
M



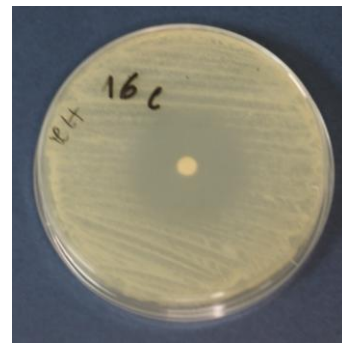
N



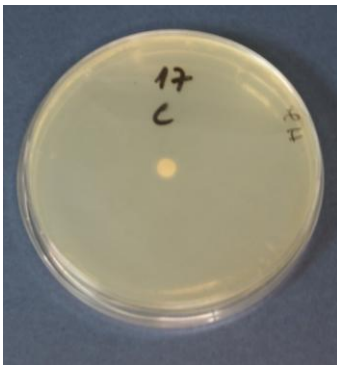
O



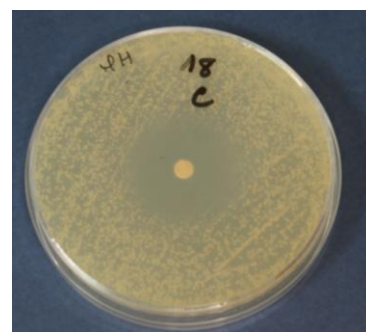
P



Q



R



S



T

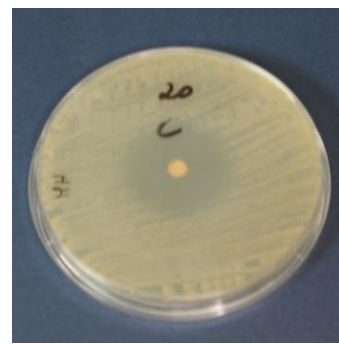
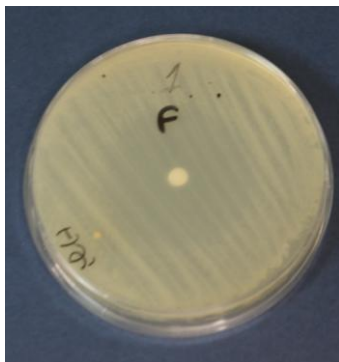


Fig. 10 - Halos de inibição do Aldeído Cinamônico de cada espécie isolada dos pacientes (1-20)

5.4.4. Resultados qualitativos- Fluconazol

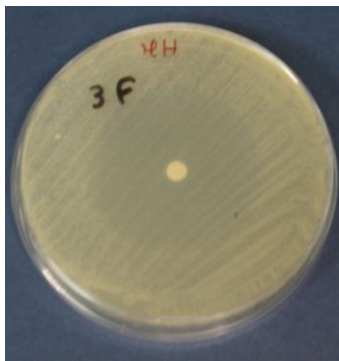
A



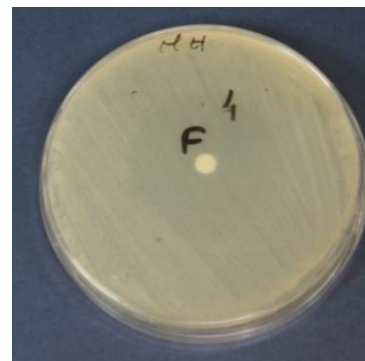
B



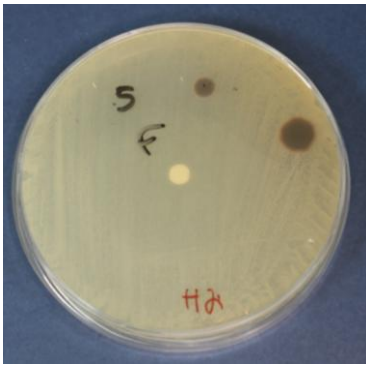
C



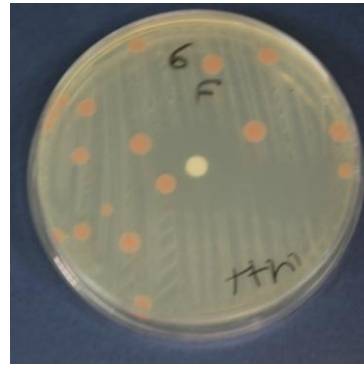
D



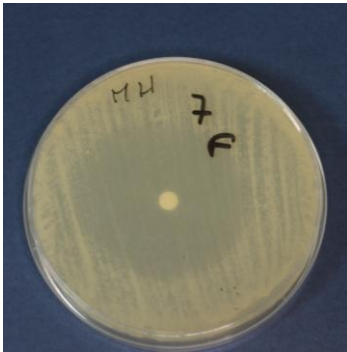
E



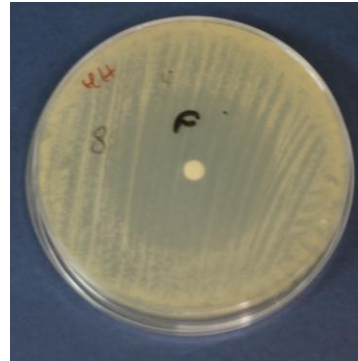
F



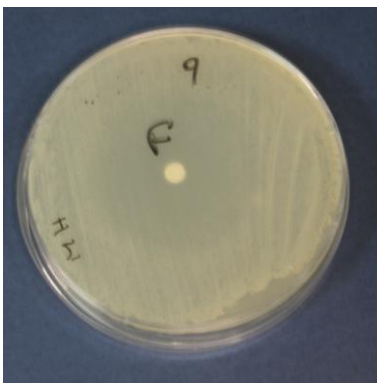
G



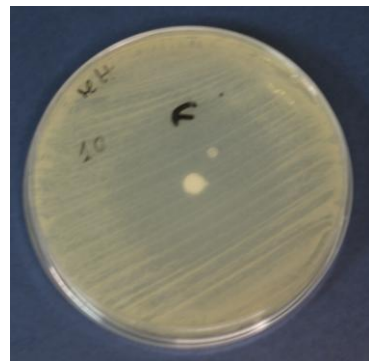
H



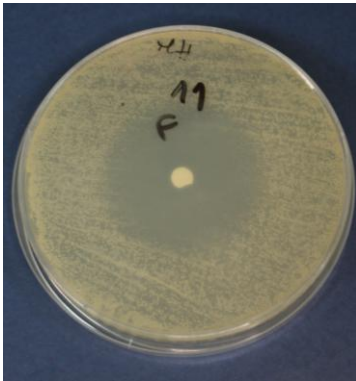
I



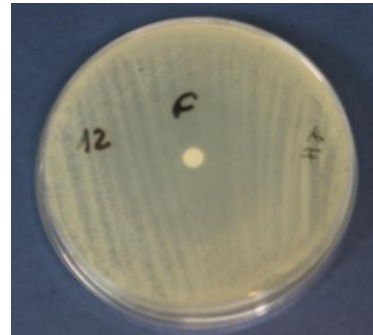
J



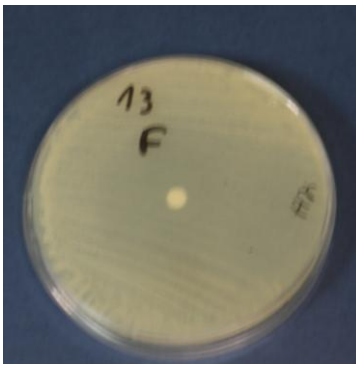
K



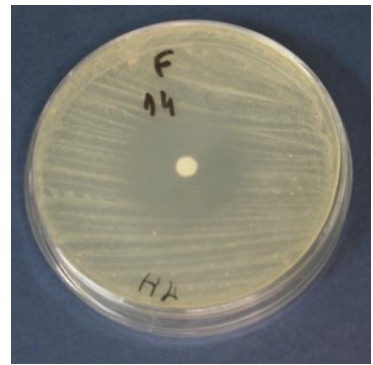
L



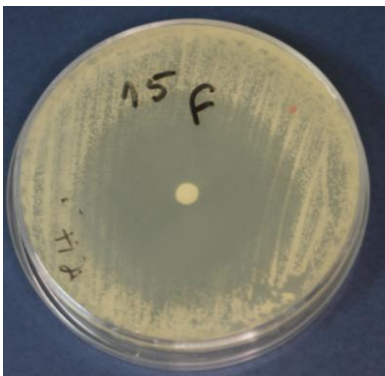
M



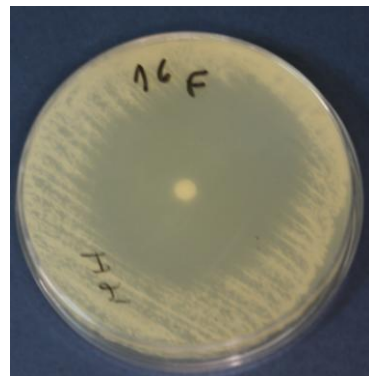
N



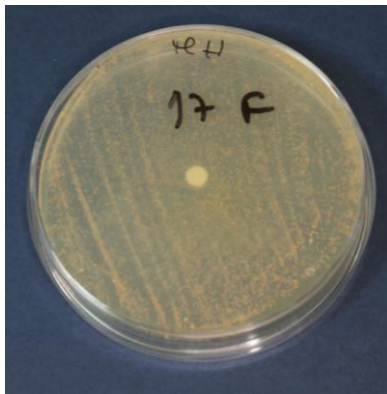
O



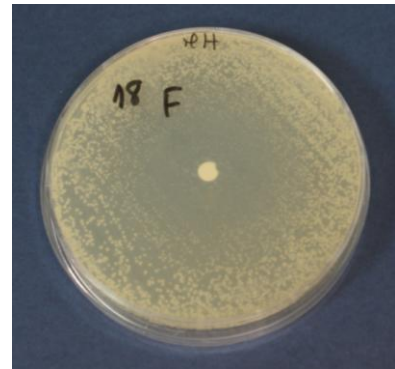
P



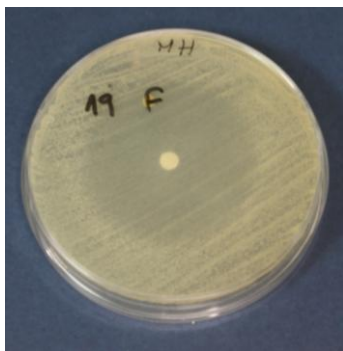
Q



R



S



T

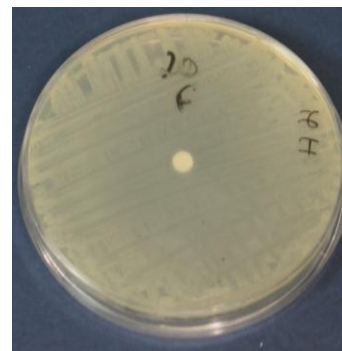


Fig. 11 - A-T) Halos de inibição do Fluconazol de cada espécie isolada dos pacientes (1-20)

6- Discussão

6 - Discussão

A estomatite protética é uma doença de carácter multifactorial, no entanto está descrito que esta doença se encontra sempre associada à presença de *Candida albicans* (Monroy TB 2005).

Esta patologia afecta cerca de 50% dos portadores de próteses removíveis (Budtz-Jorgensen 1990). No nosso estudo foi verificado, após a avaliação dos pacientes usados na nossa amostra, que 80% apresentavam sinais de estomatite protética.

Com o nosso trabalho também observamos que 87,5% dos pacientes que apresentavam sinais clínicos de estomatite protética apresentavam próteses mal adaptadas e que apenas 12,5% dos pacientes, com sinais clínicos de estomatite protética apresentavam próteses bem adaptadas, o que vem confirmar que a má adaptação das próteses pode ser um factor associado à etiologia da estomatite protética (Budtz-Jorgensen & Bertram 1970, Shulman et al. 2005, Ziss et al. 2006).

Quando relacionamos a presença de estomatite protética e o tempo de colocação das próteses, verificamos que havia uma relação directa, ou seja quanto mais tempo tinha a prótese na boca mais surgiam sinais de estomatite protética.

Estes resultados podem ser suportados com o facto de a colonização das próteses ser feita ao longo do tempo e a formação do biofilme ser prejudicial à mucosa de suporte da prótese (29, 30, 31).

Se tivermos em conta o sexo dos doentes estudados na amostra verificamos que não existe diferença na incidência da doença, confirmando que esta patologia se apresenta de forma equilibrada no género masculino e feminino (Esteves et al 2005). Há no entanto estudos que verificam que 84,1% desta patologia ocorre no género feminino (Budtz-Jorgensen 1990).

Clinicamente a estomatite protética foi classificada, por Newton, em 3 grupos sendo que a mais encontrada na nossa amostra foi a classe II (hiperemia difusa- mucosa lisa e atrófica com aspecto eritematoso em toda a região sob a prótese), confirmando o que é aceite pela maioria da comunidade científica - a classe II é a mais comum (35, 50).

Segundo Monroy, a espécie de *Candida* mais encontrada na estomatite protética é *Candida albicans* (Monroy 2007).

Para identificarmos quais as espécies de *Candida* isoladas das nossas amostras utilizamos dois meios de identificação: meio cromogénico e galerias ID32C. Como o meio cromogénico só identifica de forma fiável *Candida albicans*, foi necessária a identificação com as galerias ID32C. Com esta identificação verificamos a presença de diferentes espécies tais como, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida intermedia*.

Tendo em conta a correcta identificação das espécies confirmamos que a espécie mais comum é *Candida albicans* e verificamos que as que foram sensíveis ao fluconazol, no ensaio experimental, foram identificadas como *Candida glabrata*.

De tudo o que está descrito, no que diz respeito ao tratamento desta patologia, ainda não há um consenso. Há autores que dizem ser suficiente readaptar as próteses que se encontram mal adaptadas (Medeiros & Pacheco 2000). Outros defendem que a adaptação da prótese não é suficiente para a cura desta patologia recomendando o uso de antifúngicos associado a uma correcta higiene da prótese (35, 36).

No que diz respeito ao antifúngico a ser utilizado também não há consenso, havendo autores que defendem o uso do Miconazol a 2% (35,19) e outros que referem o uso da Nistatina (35, 37). Quando não há resposta com o uso de antifúngicos tópicos recorre-se aos sistémicos, sendo o Fluconazol o mais usado (35,38). Torna-se assim necessário continuar os estudos para se chegar a um tratamento consensual.

No nosso estudo foram testados 3 antifúngicos e um óleo essencial, sendo que foi dividido em duas fases. Numa primeira fase foram usados os 4 agentes numa estirpe de *Candida albicans* ATCC para se chegar aos dois mais eficazes e numa segunda fase, estes foram testados nas 20 amostras de *Candida* isoladas de pacientes, na Clínica de Reabilitação Oral do ISCS-Norte.

Uma vez que os dois mais eficazes foram o Fluconazol e o óleo essencial (Aldeído Cinamónico), estes foram os usados nas 20 amostras recolhidas dos pacientes da consulta de Reabilitação Oral do ISCS-Norte

Se tivermos em conta que o Mycostatin® tem na sua constituição Aldeído Cinamónico e Nistatina este produto comercial deveria ter melhor efeito que os dois em separado, daqui podemos considerar que estes dois compostos juntos não potenciam o efeito antifúngico.

Com os testes de susceptibilidade do Fluconazol e do aldeído verificamos que o que teve uma maior estabilidade comportamental foi o Aldeído Cinamónico, confirmando assim o efeito antifúngico deste composto (Bhavanani;Ballow, 1992, Sharma e col., 1984; Ehrich e col.1995; Pawar e col., 2006).

No entanto, relativamente ao Fluconazol é importante destacar o facto de este apenas ser eficaz para a espécie *Candida glabrata*, o que mostra a resistência de *Candida albicans* a este fármaco, o que pode explicar a ideia de que o Fluconazol não é um fármaco 100% eficaz para o tratamento da Estomatite Protética uma vez que após o fim do tratamento, muitas vezes, esta volta a instalar-se, ou seja, como foi descrito por Batista em 1996, a actividade dos antifúngicos dos grupos dos Azóis é fungistática e não fungicida.

Com o nosso trabalho, após análise estatística construiu-se um teste de hipótese à diferença entre os valores esperados da área de inibição dos 2

fármacos e este teste assegura-nos que a área de inibição do Aldeído Cinamónico é superior à do Fluconazol com um grau de confiança de 95%. Daqui podemos concluir que o Aldeído Cinamónico é um fármaco que poderá vir a ser usado no tratamento da Estomatite Protética sendo, no entanto, necessários mais estudos para este ser aplicado *in vivo*, uma vez que no nosso estudo não foi avaliada a toxicidade deste fármaco nem qual a concentração suportável pelo organismo humano.

7.Conclusões

7-Conclusões

Com este trabalho concluímos que a espécie de *Candida* mais encontrada em doentes com estomatite protética é *Candida albicans* seguida das espécies *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida intermedia*.

Após a realização do ensaio experimental chegamos à conclusão que dos quatro agentes testados (Mycostatin®, Nistatina, Fluconazol e Aldeído Cinamónico) tiveram melhores resultados, por ordem decrescente, o Fluconazol o Aldeído Cinamónico, a Nistatina.e o Mycostatin®.

Depois de verificarmos que os agentes com melhores resultados tinham sido o Fluconazol e o Aldeído Cinamónico, usamos estes dois agentes nas 20 amostras isoladas chegando assim à conclusão que o que teve maior eficácia foi o Aldeído Cinamónico.

Sendo esta a conclusão mais importante, devemos referir que será necessário continuar os estudos no sentido de chegar a um agente eficaz, e em concentrações não tóxicas, à base de Aldeído Cinamónico para o tratamento da Estomatite Protética, ou associa-lo a outros agentes químicos, tais como a clorexidina ou cloreto de cetilpiridínio ou triclosan para ser usado como desinfetante das próteses dentárias.

8 Bibliografia

8-Bibliografia

- [1] Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in Denture Stomatitis. *Scand J Dent Res* 1974; 82: 151-190.
- [2] Budtz-Jorgense E. Oral Mucosal Lesions associated with the wearing of Removable Dentures. *J Oral Pathol* 1981; 10: 65-80.
- [3] Arendorf T, Walker D. Denture Stomatitis: a review. *J Oral Rehabil* 1987; 14: 217-27.
- [4] Budtz-Jorgensen E. A prosthodontics for elderly. Diagnosis and treatment. Quintessence Publishing Co, Inc Ed. 1999.
- [5] Nyquist G. A study of Denture Sore Mouth – An Investigation of traumatic, allergic and toxic lesions of the oral mucosa. Uppsala 1952: 1-154.
- [6] Santarpia R, Pollock J, Renner R, Spiechowicz E. An in vitro replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. *J Prosthet dent* 1990; 18: 102-106.
- [7] Russotto S. The role of *Candida albicans* in the pathogenesis of angular cheilosis. *J posthet Dent* 1980; 44(3): 243-246.
- [8] Dreizen S: Oral Candidiasis. *Amer J Med* 1984: 28-33.
- [9] Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerontology* 2005; 22: 168–76.
- [10] Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2004; 4: 369–76.

- [11] Costa CR, Lemos JA, Passos XS et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia* 2006; 162: 45–50.
- [12] Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kussano JU, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian.
- [13] Klotz S, Drutz D, Zajic J. Factors governing adherence of *Candida* Species to plastic surfaces. *Infect Immun* 1985; 50(1): 97-101.
- [14] Carvalho TRO, Figerio MLMA, Yamada MCM, Birman EG. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. *Pesqui Odontol Brás* 2000;14 (3): 219-224.
- [15] Owall B, Kayser AF, Carlsson GE. *Odontología Protésica principios y estrategias terapéuticas*. Mosby 1997: 71-73.
- [16] Geering AH, Kundert M. *Atlas de Protesis Total Y Sobredentaduras*. 2ª edición. Masson-Salvat, 1993: 6-7.
- [17] Budtz- Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable denture. *J Oral Pathol* 1981; 10: 65-80.
- [18] Azul A.M, Afonso A, Portugal C, FigueiraIMH, Lobo MJC. *Atlas de Patologia da Mucosa Oral*. AEFMDUP 1992: 13.
- [19] Bissel V, Felix DH, Wray D. (1993) Comparative trial of fluconazol and anphotericin in the treatment of denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Jul*; V1:35-39
- [20] Baena Monroy T, Maldonado M V, Franco M F, Aldape BB, Quindós G, Sánchez V L.O. Colonização por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y

Streptococcus mutans en pacientes portadores de prótesis dentales. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005; 10: E27-E39

[21] Budzt-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. Scand. J. Dent. Res. 1974; 82: 1-51.

[22] Bergendal T. Treatment of denture stomatitis. A clinical microbiological and histological evaluation. Stockholm: Karolinska Institute and National Bacteriological Laboratory, 1982.

[23] Jenkinson H, Harish C. Congregation of *Streptococcus sanguis* and other Streptococci with *Candida albicans*. Infec Immun 1990; 58: 1429-1436.-

[24] Nikawa H, Egusa H. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. Oral Microbiol Immunol 2001; 16:279-284.

[25] Grant AA, McCord JF. (2002) Identification of complete denture problems: a summary. British Dental Journal Ago 12; 189 (3): 128-134.

[26] Jabra-rizk MA, Falkler WA Jr., Merz WG, Baqui AA MA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 17-22.

[27] Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum. 2001 .Biofilm formation by fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J. Bacteriol. 183: 5385-5394.

[28] Samaranayake LP, Arjuna NB. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. Oral Biology 1998; 43: 999-1007.

[29] Samaranayake Y.H; Cheung B.P.K; Parahitiyawa N; Seneviratne C.J; Yau J.Y.Y; Yeung K.W.S; Samaranayake L.P. Synergistic activity of lysozyme and

antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces
Oral Biology 2009; 54: 115-126.

[30] Budtz-Jorgensen E. *Candida* – associated denture stomatitis and angular cheilitis. In Samaranayake LP, Macfarlane TW, editors. *Oral candidosis*. London: Wright; 1990. P. 156-83

[31] Budtz-Jorgensen E. Ecology of *Candida* – associated denture stomatitis. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 12: 170-85

[32] Kojic M. E; Darouiche R.O. *Candida* Infections of Medical Devices *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2004: 255-267.

[33] Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum. 2001. Biofilm formation by fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183: 5385-5394.

[34] Hawser, S.P., and L. J. Douglas. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun.* 62: 915-921.

[35] Jabra-rizk MA, Falkler WA Jr., Merz WG, Baqui AA MA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 17-22.

[36] Hanser, S. P., and L. J. Douglas. 1995. Resistance of *Candida Albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2128-2131.

[37] Nikawa H, Taizo H. denture plaque and recent concerns. *J Dent* 1998; 26: 299-304.

[38] Balerdi I, Aguirre JM, Ajuria B, Pontón J, Quindós G. Analyse clinique et microbiologique de la stomatite par prothese. *Actualités odontostomatologiques* 1994; 186: 173-183.

- [39] Williams, D. W. Kuryama T., Biofilms and oral candidosis: treatment and prevention, *Periodontology* 2000, V55, 250-265.
- [40] Ucar B.A; Rojas M. G; Ballester L.A. Acción de Agents Químicos en la eliminacion de *Candida albicans* sobre próteses dentales. *Scielo Venezuela* 2007; 45.
- [41] Haggard K. Arvelo B. De Genaro P. Recomendaciones para la limpieza de prótesis removibles. *Revista Venezuela Odontológica*. 2002; 55.
- [42] Sheen S, Harrinson A. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. *J Prosthet Dent*. 2000; 84: 594-601.
- [43] Medeiros BSV, Pacheco FA. Relato de um caso clinico de uma lesão por dentadura(estomatite por prótese) X uso de um antifúngico. *Revista Brasileira de Patologia Oral* 2000:V.1, N.1,1-4.
- [44] Kulak, Y; Anika,A.; Delibalta, N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis *J. Oral Rehabil*, Oxford Oct, 1997: V.24, N.10, 788-790.
- [45] Stafford GD, Arendorf GD, Huggett R. The effect of overnight drying and water immersion on candidal colonization and properties of complete dentures. *J Dent* 1986; 14: 52-56.
- [46] Farias NC, Buffon MM, Cini R.Avaliação in vitro da acção antifungica do digluconato de clorexidina e nistatina no controle do crescimento de *cândida albicans*.*Visão Academica Curitiba* Jul.Dez 2003: V4,N2: 83-88.
- [47] Mähönen k, Virtanen K, Lamas M.The effect of prosthesis didinfection on salivary microbial levels.*Journal of Oral Rehabilitation* April 1998, v.25:304-310
- [48] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193

- [49] Douglas LJ. Medical importance of biofilms in candida infections. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 139-143.
- [50] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PB, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation By the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001; 183: 5385- 5394.
- [51] Guo N, Wu X, YU L, Liu J, Meng R, Jin J, Lu H, Wang X, Yan S, Deng X. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 1-9.
- [52] Guang-Fang Xu, Bao-An Song, Pinaky S.B., song Yang, Pei-Quan Zhang, lin-Hong jin, Wei Xue, De-Yu Hu «, Ping Lu. Synthesis and antifungal activity of novel s-substituted 6-fluoro- 4-alkyl (aryl) thioquinazoline derivatives, Bioorganic e Medicinal Chemistry 15 (2007)3768-3774
- [53] Bergld, A.M., Georgiadis, S. New antifungic drugs: review Visão Acadêmica, Curitiba jul-dez 2004: V5, N2. 159-172.
- [54] Goergopapadakou N.H.,TKacks J.S., The Fungal cell wall as a drug target Trends Microniol 1995:. N3, 98-104.
- [55] Jorgensen E. B., Holmstrup P., Krogh p., Fluconazole in the Traetment of Candida- Associated Denture Stomatitis, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dec. 1988, V.32 1859-1863
- [56] KawasakiK, Masubichi M, Morrikami K, Design and Synthesis of Novel Benzofurans as a New Class of Antifungal Agents Targeting Fungal N-Myristoyltransferase. Part 3. Biog e Med Chem Let.2003: N.13, 87-91.
- [57] Osswald W, Guimarães S. Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas. Porto Editora, 4ª edição: 948.

- [58] Frank CO, Alistair J P, Brown A R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*. June 2003: V11.6:272-279.
- [59] Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 14: 586-597.
- [60] Sartorato, A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Figueira, G.M.; Duarte, M. C. T.; Redher, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004: v. 35, n. 4, 275-280.
- [61] Nisbet IJ, Moore M 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Curr Opin Biotechnol* 8,708-712.
- [62] Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 1998: v. 26, n. 2, 118-122.
- [63] P. Pozzatti, LA Scheid, TB Spader, ML Atayde, JM Santurio, SH Alves. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can J Microbiol.* 2008: 54, 950-960.
- [64] Simões, C. M.O. Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2007. 1102.
- [65] Siqui AC, Sampaio, ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MFS 2000. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 16: 38-43.

- [66] Bhavanani SM, Ballou CH 1992. New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 13: 528-534.
- [67] Cunha AP. Plantas na Terapêutica Farmacologica e Ensaio Clínicos. *Gulbenkian* 2008: 177-180.
- [68] Alonso J R, (1998) Tratado de Fitoterapia, Bases Clínicas y Farmacológicas, Ed. Iris, 334-6.
- [69] Vanaclocha B, Caniguera S, (edit.) (2003) Fitoterapia Vademecum de Prescripción, 4ª. Ed. Masson, S.A., 159-60.
- [70] Sharma A, Ghanekar AS, Padwal-Desai SR, Nadkarni GB, (1984) Microbiological status and antifungal properties of irradiated spices, *J. Agric. Food Chem.*32: 1061-13
- [71] Ehrlich J, Bauermann U, Thomann R, (1995) Antimikrobielle Wirkung von CO₂- Gewürzextrakten von Bohnenkraut bis Ceylon-Zimt., *Lebensmitteltechnik* (11): 51-3
- [72] Pawar VC, Thaker VS. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*, *Mycoses* 2006; 49 (4): 316-23.

9 - Anexos



DIPLOMA

Vimos por este meio certificar que,
Magalhães D, Santos MA, Oliveira S, Mendes JM



apresentou um poster com o tema,

Reabilitação oral em doente bruxomana – Caso clínico

no XXIX Congresso da SPEMD, no dias
15, 16 e 17 de Outubro de 2009, em Lisboa.

O Presidente do Congresso,

JOSÉ PEDRO FIGUEIREDO

O Presidente da Comissão Científica

LUÍS PIRES LOPES



XXIX CONGRESSO DA SPEMD

DIPLOMA



Vimos por este meio certificar que,
Santos MA, Magalhães D, Oliveira S, Mendes JM

apresentou um poster com o tema,
Reabilitação Oral fixa com recurso a implantes dentários e dentes naturais – caso
clínico

no XXIX Congresso da SPEMD, no dias
15, 16 e 17 de Outubro de 2009, em Lisboa.

O Presidente do Congresso,

JOSÉ PEDRO FIGUEIREDO

O Presidente da Comissão Científica

LUÍS PIRES LOPES

90 ANOS
SPEMD



54^{ème} CONGRÈS DU GIRSO

23 AU 24 AVRIL 2010

Groupement International pour la Recherche
Scientifique en Stomatologie et Odontologie

La Grande Motte, France

CERTIFICAT

Il est certifié que la communication orale intitulée :

"Évaluation in vitro de la susceptibilité de Candida albicans à 4 agents chimiques".

a été présentée par :

Santos M.A.; Coelho C.; Mendes J.M.

Professeur Frédéric Cuisinier
Président du 54^{ème} Congrès du GIRSO



Groupement International pour la Recherche
Scientifique en Stomatologie et Odontologie

54^{ème} CONGRÈS DU GIRSO

23 AU 24 AVRIL 2010

La Grande Motte, France

CERTIFICAT

Il est certifié que la communication sous forme de Poster intitulée :

"Gouttière occlusale pour la propulsion mandibulaire".

a été présentée par :

Pinto L., Santos M.A., Coelho C., Mendes J.M.

Professeur Frédéric Cuisinier
Président du 54^{ème} Congrès du GIRSO



CERTIFICA-SE QUE

M^a Arminda Santos

APRESENTOU UM PÓSTER DE INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA COM O TÍTULO:

“AVALIAÇÃO IN VITRO DA SUSCEPTIBILIDADE DA CANDIDA ALBICANS A 4 AGENTES QUÍMICOS”

NO XIX CONGRESSO ANUAL DA ORDEM DOS MÉDICOS DENTISTAS QUE DECORREU, NO EUROPARQUE EM SANTA MARIA DA FEIRA - PORTUGAL, DE 11 A 13 DE NOVEMBRO DE 2010.



O BAIXONÁRIO DA ORDEM DOS MÉDICOS DENTISTAS

Orlando Monteiro da Silva
ORLANDO MONTEIRO DA SILVA

55^{ème} CONGRÈS DU GIRSO

Lille : 29 - 30 AVRIL 2011

Faculté de Chirurgie Dentaire

Président du GIRSO Ch. Pilipili Belgique	Président sortant M.C. Manzanares Espagne	Vice-présidents J. Moreira Portugal P. Menghini Italie	Trésorier J.M. Ustrell Espagne Trésorier adjoint F. Salazar Portugal	Secrétaire J.J. Pacheco Portugal Secrétaire adjoint F. Cuisinier France
---	--	---	---	--

Organisation 55^{ème} Congrès Lille – <http://chirdent.univ-lille2.fr>
E.Delcourt – Debruyne, F. Boschin, M. Ould Aklouche, F. Ribas
France

Attestation de Présence – 55^{ème} Congrès GIRSO 2011.

Je, soussigné(e) Malika Ould aklouche, trésorière et secrétaire du Comité d'organisation du 55^{ème} Congrès GIRSO 2011, certifie par la présente que Melle M Arminda Santos, en qualité de Intervenante de la session Poster et Short Communications, a régulièrement suivi les séances du 55^{ème} Congrès GIRSO 2011, qui s'est tenu les 29 et 30 avril 2011 à la Faculté Dentaire de Lille, place de Verdun, 59 000 Lille.

Fait à Lille, le 30 avril 2011.

Malika Ould aklouche



Université Lille2
Droit et Santé



Université Lille Nord de France



Renseignements et inscriptions : <http://chirdent.univ-lille2.fr>
Courriers à adresser : GIRSO, Faculté de Chirurgie Dentaire, place de Verdun 59 000 Lille