

Atividade antifúngica in vitro de enxaguatórios bucais sobre *Candida* spp.

Alessandro Leite CAVALCANTI^a, Raphael Oliveira de MENESES^a,
Klédysson Freitas DA SILVA^a, Stênio Carvalho Vieira de Lorena e SÁ^a,
Leopoldina de Fátima Dantas de ALMEIDA^b, Ricardo Dias de CASTRO^b

^aDepartamento de Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
UEPB – Universidade Estadual da Paraíba, 58109-753 Campina Grande - PB, Brasil

^bDepartamento de Clínica e Odontologia Social, Centro de Ciências da Saúde,
UEPB – Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa - PB, Brasil

Cavalcanti AL, Meneses RO, Da Silva KF, SÁ SCVL, Almeida LFD, Castro RD. In vitro antifungal activity of mouthwashes against *Candida* spp.. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(5): 313-17.

Resumo: Este estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica de enxaguatórios bucais disponíveis no comércio brasileiro sobre as cepas de *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e de *Candida krusei* (ATCC 6538). Avaliaram-se cinco diferentes enxaguatórios, a saber: Oral-B[®], Colgate Plax Overnight[®], Equate[®], Cepacol[®] e Periogard[®]. Foi adotada a Nistatina[®] como controle positivo. Para determinação da atividade antifúngica, foi utilizado o método de difusão em meio sólido (Ágar Sabouraud Dextrose), de modo que foram inseridos 50 µL de cada solução pronta para uso nos poços confeccionados no meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 37 °C. A análise dos dados foi feita por meio da mensuração dos halos com uma escala milimétrica, sendo estes considerados quando iguais ou superiores a 10 mm de diâmetro. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA e pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando-se o *software* GraPhad Prism 4.0. Foram observadas diferenças significativas na atividade antifúngica do Oral-B[®] (p < 0,001), Colgate Plax[®] (p < 0,01) e Cepacol[®] (p < 0,01) sobre *Candida tropicalis*, quando comparada com a apresentada pela nistatina. Sobre *C. krusei*, não foi observada atividade antifúngica da Nistatina[®], evidenciando-se, assim, uma cepa resistente. Porém, todos os enxaguatórios foram capazes de inibir o crescimento da levedura avaliada, não havendo diferenças estatísticas entre Oral-B[®] e Periogard[®]/Cepacol[®]/Equate[®] (p > 0,05), Colgate plax[®] e Cepacol[®] (p > 0,05), Periogard[®] e Equate[®]/Cepacol[®] (p > 0,05), bem como entre Equate[®] e Cepacol[®] (p > 0,05). Os resultados sugerem que o cloreto de cetilpiridínio e o gluconato de clorexidina, principais compostos ativos dos enxaguatórios bucais, constituem importantes agentes que são, possivelmente, responsáveis pela atividade antifúngica sobre as cepas utilizadas neste estudo.

Palavras-chave: Antissépticos bucais; *Candida* spp.; nistatina; clorexidina.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of mouthwashes available in Brazil on *Candida tropicalis* (ATCC 13803) and *Candida krusei* (ATCC 6538) strains. Five different brands of mouthwashes were assessed: Oral-B[®], Colgate Plax Overnight[®], Equate[®], Cepacol[®] and Periogard[®]. Nystatin[®] was used as a positive control. The antifungal activity was evaluated by the agar diffusion method (Agar Sabouraud Dextrose). Fifty microliters of each ready-to-use solution were poured into wells made in the solid culture medium. The plates were incubated in bacteriologic incubators at 37 °C for 48 hours. The results were obtained by measuring the zones of microbial growth inhibition (in mm) and only those with a diameter of 10 mm or more were considered. The data were analyzed by ANOVA and Tukey's post-test, with a 5% significance level. Statistically significant differences were observed in the antifungal activity of Oral-B[®] (p < 0.001), Colgate Plax[®] (p < 0.01) and Cepacol[®] (p < 0.01) against *Candida tropicalis*, as compared to nystatin. Nystatin did not show antifungal activity against *C. krusei*, which appears as a resistant strain. However, all the mouthwashes were able to inhibit the growth of the evaluated yeast, showing no differences between Oral-B[®] and Periogard[®]/Cepacol[®]/Equate[®] (p > 0.05), Colgate Plax[®] and Cepacol[®] (p > 0.05), Periogard[®] and Equate[®]/Cepacol[®] (p > 0.05), or between Equate[®] and Cepacol[®] (p > 0.05). These results suggest that cetylpyridinium chloride and chlorhexidine gluconate, which are the most important active components of the mouthwashes, are important agents that are possibly responsible for the antifungal activity against the strains used in this study.

Keywords: Mouthwashes; *Candida* spp.; nystatin; chlorhexidine.

Introdução

O gênero *Candida* spp. é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui a causa relevante das infecções de corrente sanguínea, respondendo por cerca de 8% dos casos das infecções documentadas neste sítio.^{1,2} As infecções por *Candida* spp. são normalmente desenvolvidas em consequência de alterações na resposta imunológica, o que pode gerar microambientes diferentes e, portanto, condições variadas de crescimento e na morfologia das células fúngicas. Essas diferentes formas de se expressarem fazem da *Candida* spp. a maior causadora de infecções fúngicas em seres humanos.³⁻⁵

Espécies não albicans, incluindo *C. tropicalis* e *C. krusei*, respondem atualmente por 50% das infecções invasivas, apresentando peculiaridades de história natural e sensibilidade a antifúngicos. A mortalidade geral de fungemias por *Candida* spp. tem sido expressiva, tornando essa complicação infecciosa um grande desafio para os clínicos que trabalham em hospitais em diferentes países.¹

Na vigência de processos infecciosos da cavidade oral já consolidados, o profissional deverá agir de forma terapêutica, implementando medidas tanto de controle mecânico quanto químico da microbiota, de forma a restabelecer seu equilíbrio o mais prontamente possível; dessa forma, a utilização de antimicrobianos se faz necessária.^{6,7} Para tal, as soluções ou géis à base de clorexidina são os mais utilizados⁸, não se devendo desvincular do universo de tratamento os agentes não iônicos a exemplo do triclosam e das substâncias naturais, como cacau, própolis, alcaloides vegetais (sanguinarina, extrato de malva), quitosano, agentes oxigenantes, enzimas, xilitol, como também timol, eucaliptol e mentol. Desse modo, sabe-se que quando as fungemias já possuem um poder invasivo bem preponderante, faz-se necessário o uso dos derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol), posto que estes possuem um efeito terapêutico sistêmico mais eficaz frente aos agentes tópicos.^{7,9-11}

Além dos meios terapêuticos convencionais e já comprovados farmacologicamente, soluções à base de produtos naturais têm sido utilizadas como antimicrobianos, destacando-se o uso de própolis e óleo essencial de sálvia, que, segundo diversos estudos, apresentam a mesma eficácia

antimicrobiana quando comparada com a de alguns produtos industrializados, como o Periogard[®], o Parandontax[®], o Listerine[®] e o Malvatricim[®].¹²⁻¹⁷

Dentre os agentes utilizados na prevenção e no tratamento de infecções da cavidade oral, destacam-se os enxaguatórios bucais, que são indicados para auxiliar na remoção química de biofilmes orais, controlando o crescimento microbiano e, conseqüentemente, prevenindo possíveis infecções.¹⁰ Nesse sentido, Araújo et al.¹⁸ ressaltam a importância da utilização desses enxaguatórios para prevenção de infecções hospitalares em pacientes que se submetem a procedimentos invasivos.

Diante dessa premissa, foi propósito deste trabalho avaliar a atividade antifúngica dos enxaguatórios bucais sobre espécies de *Candida* spp., microrganismos oportunistas, reconhecidos como causadores das infecções micóticas da cavidade oral.

Material e método

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Oral do Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Os testes para avaliar a atividade antimicrobiana por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos enxaguatórios bucais testados foram realizados pelo método de difusão em meio sólido¹⁹⁻²¹: em placas de Petri descartáveis e estéreis (15 × 90 mm) (Cral Laboratórios Ltda., Cotia - SP), foi depositado 1 mL do inóculo (10⁸ UFC.mL⁻¹) de cada cepa, previamente preparado e mensurado pela escala de MacFarland. Foram adicionados 20 mL de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), fundido e resfriado a 45 - 50 °C, realizando-se homogeneização lenta. Após solidificação do meio, foram realizadas cavidades com cânulas de vidro de 6 mm de diâmetro^{15,22}. Nessas cavidades, foram inoculados 50 µL de cada um dos enxaguatórios utilizados e da substância utilizada como controle positivo, em suas concentrações prontas para uso (Tabela 1).

Como controle positivo, foi utilizado um antifúngico padrão (Nistatina[®]), em suspensão, na concentração de 100.000 UI (Laboratório SEM S/A, São Bernardo do Campo - SP).

Tabela 1. Especificações dos enxaguatórios bucais utilizados. João Pessoa - PB, 2009

Produto	Fabricante	Composto ativo
Oral-B [®]	Gillette do Brasil Ltda	Cloreto de cetilpiridínio
Colgate Plax Overnight [®]	Colgate Palmolive Ind. Com. Ltda	Cloreto de cetilpiridínio
Periogard [®]	Colgate Palmolive Argentina SA	Gluconato de Clorexidina
Equate [®]	Ind. Com. e Repres. Poli Products Ltda	Cloreto de cetilpiridínio
Cepacol [®]	Sanifil-Aventis Farmacêutica Ltda	Cloreto de cetilpiridínio

Cada ensaio foi realizado em triplicata e o resultado foi expresso pela média aritmética dos halos de inibição obtidos. A atividade biológica dos produtos foi considerada positiva quando a média dos halos de inibição foi igual ou superior a 10 mm de diâmetro.^{23,24}

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA e pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando-se o *software* GraPhad Prism 4.0.

Resultado

Os resultados do teste de difusão em meio sólido estão apresentados na Tabela 2 e se referem às médias aritméticas dos halos de inibição em milímetros, com os respectivos desvios padrão.

Foram observadas diferenças significativas na atividade antifúngica do Oral-B® ($p < 0,001$), Colgate Plax® ($p < 0,01$) e Cepacol® ($p < 0,01$) sobre *Candida tropicalis*, quando comparada com a apresentada pela nistatina.

Sobre *C. krusei*, não foi observada atividade antifúngica da Nistatina®, evidenciando uma cepa resistente. Porém, todos os enxaguatórios foram capazes de inibir o crescimento da levedura avaliada, não havendo diferenças estatísticas entre Oral-B® e Periogard®/Cepacol®/Equate® ($p > 0,05$), Colgate plax® e Cepacol® ($p > 0,05$), Periogard® e Equate®/Cepacol® ($p > 0,05$), bem como entre Equate® e Cepacol® ($p > 0,05$).

Discussão

Observou-se que as soluções testadas, nas concentrações comercialmente disponíveis, apresentaram atividade inibitória sobre as cepas de *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Faz-se necessário salientar a ausência de atividade antifúngica da Nistatina®, um fármaco com eficácia testada, sobre a cepa de *Candida krusei*, fato que evidencia uma possível resistência dessa cepa ao produto padrão utilizado.

Os enxaguatórios bucais, de um modo geral, agiram com eficiência para inibição de crescimento tanto sobre *Candida tropicalis* quanto sobre *Candida krusei*, destacando-se o Oral-B® que, quando em contato com a cepa de *Candida tropicalis*, promoveu a formação de um halo de inibição maior que o próprio controle positivo (Nistatina®); destaque-se também o Colgate Plax Overnight®, que produziu um halo de inibição considerável frente aos outros enxaguatórios e ao controle positivo (Nistatina®) (Tabela 2).

Tais resultados geram futuras discussões acerca da resistência dessa cepa de *Candida tropicalis* tanto à nistatina como aos derivados azólicos, que fazem parte do leque de opções de medicamentos antifúngicos – como o fluconazol e o itraconazol – muito preconizados pelos cirurgiões-dentistas no tratamento de candidose oral, uma fungemia bastante recorrente nos consultórios.^{1,2,10}

É importante ressaltar que o teste de difusão em meio sólido não representa, necessariamente, um método seguro para se determinar atividade antimicrobiana, na medida em que as propriedades físico-químicas dos produtos testados podem influenciar na difusão do meio de cultura, facilitando ou dificultando o contato do agente ativo com os microrganismos, uma etapa fundamental para ação do mesmo.^{8,25}

A utilização de cepas de *Candida tropicalis* e *C. krusei* é justificada, uma vez que as mesmas fazem parte da microbiota normal da cavidade oral, constituindo-se em microrganismos oportunistas, dotados de alta patogenicidade relacionada, principalmente, a sua capacidade invasiva e de formar biofilme.³⁻⁵

Os enxaguatórios bucais cujo princípio ativo é o cloreto de cetilpiridínio – o Oral-B® e o Colgate Plax Overnight® – foram os mais efetivos na atividade inibitória, comprovando os achados previamente reportados por Bugno et al.²⁶

O cloreto de cetilpiridínio é um princípio ativo com efetividade garantida.²⁶ Portanto, os resultados possibilitam induzir que a inibição do crescimento microbiano dada pelos enxaguatórios reforça a evidência da atividade antimicrobiana do cloreto de cetilpiridínio sobre as duas cepas postas em teste.

Ressalta-se a importância da utilização dos enxaguatórios bucais sob prescrição do cirurgião-dentista, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de desequilíbrio ecológico da cavidade oral e de aquisição de resistência microbiana aos agentes utilizados, além do aparecimento de lesões teciduais, provocadas principalmente pela presença de álcool, assim como relataram Blanc et al.²⁷

Os resultados desta pesquisa oferecem uma oportunidade para investigação clínica da atividade antifúngica de enxaguatórios, contribuindo, assim, para o conhecimento acerca do tratamento de infecções micóticas superficiais da cavidade oral.

Tabela 2. Valores das médias aritméticas dos halos de inibição mensurados em milímetros, com representação dos respectivos desvios padrão. João Pessoa - PB, 2009

Microorganismos	Oral-B®	Colgate plax overnight®	Periogard®	Equate®	Cepacol®	Nistatina®
<i>Candida tropicalis</i>	22,6 ± 1,7	22,0 ± 1,0	18,6 ± 1,3	13,6 ± 0,8	20,6 ± 0,6	13,3 ± 0,8
<i>Candida krusei</i>	18,3 ± 1,3	24,0 ± 1,5	17,3 ± 0,3	16,6 ± 0,8	20,0 ± 1,5	–

Conclusão

Os enxaguatórios bucais avaliados promoveram inibição de crescimento das cepas de *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, patógenos oportunistas da cavidade oral, sendo esta atividade mais expressiva para o Oral-B® e Colgate Plax Overnight®.

Referências

- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:599-607.
- Ribeiro EL, Guimarães RI, Inácio MCC, Ferreira WM, Cardoso CG, Dias SMS, et al. Aspectos das leveduras de candida vinculadas as infecções nosocomiais. Newslab. 2004; 64:106-28.
- Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J. The MAP kinase signal transduction network in candida albicans. Microbiology. 2006;152:905-12.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. Candida biofilms: an update. Eukaryotic Cell. 2005;4:633-8.
- Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of Candida albicans biofilms. Arch Oral Biol. 2006;51:672-80.
- Ferrarini M, Baby AR, Pinto CASO, Velasco MVR, Pinto TJA, Kaneko TM. Influência do Kollidon® 90F e do Polyox® WSR301NF na força de adesão de comprimidos bucais de clorexidina. Lat Am J Pharm. 2007;26:541-7.
- Torres CRG, Kubo CH, Anido A, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso em odontologia. RPG. Rev Pos-Grad. 2000;3:43-52.
- Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:108-13.
- Marinho BVS, Araújo ACS. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. Int J Dent. 2007;6:124-31.
- Lima ADS, Grégio AMT, Tanaka O, Machado MAN, Franca BHS. Tratamento das ulcerações traumáticas bucais causadas por aparelhos ortodônticos. Rev Dental Press Ortodont Ortoped Facial. 2005;10(5):30-6.
- Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulações para a higiene bucal. Rev Bras Ciênc Farm. 2006;42:395-404.
- Sperança PA, Santiago LM, Carvalho TBT, Neves WKF. Verificação da atividade antimicrobiana de soluções à base de própolis, sobre microbiota oriunda de bolsas peri-odontais: estudo in vitro. Periodontia. 2007;17:54-9.
- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev Bras Farmacogn. 2008;18:447-54.
- Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microorganismos presentes na saliva de humanos. Rev Bras Farmacogn. 2008;18:84-9.
- Alves PM, Leite PHAS, Pereira JV, Pereira LF, Pereira MSV, Higino JS, et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero candida da cavidade oral: uma avaliação in vitro. Rev Bras Farmacogn. 2006;16:192-6.
- Almeida RVD, Castro RD, Pereira MSV, Paulo MQ, Santos JP, Padilha WVN. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2006;6(1):87-92.
- Zanin SMW, Miguel MD, Barreira SMW, Nakashima T, Cury CD, Costa CK. Enxaguatório bucal: Principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo estrato hidroalcoólico de saliva officinalis L. Visão acadêmica. 2007;8(1):19-24.
- Araújo RJG, Oliveira LCG, Hanna LMO, Corrêa AM, Carvalho LHV, Alvares NCF. Análise de percepções e ações de cuidados bucais realizados por equipes de enfermagem em unidades de tratamento intensivo. Rev Bras Ter Intensiva. 2009;21(1):38-44.
- Bauer AWMM, Kirby JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493-6.
- Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 3th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 739-87.
- Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem Anal. 2000;11:137-48.
- Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WVN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2004;4(1):33-8.
- Sakar MK, Tamer AU, Tokur S. Antimicrobial activities of some hypericum species growing in Turkey. Fitoterapia. 1998;59:49-52.
- Wong-Leung YL. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. Fitoterapia. 1998;69(1):11-6.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentra-

- ção mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn. 2008;18:301-7.
26. Bugno A, Niccolleti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. Rev Inst Adolfo Lutz. 2006;65:40-5.
27. Blanc SAL, Baruzzi AM, Pannuti CM. Colutórios que contêm álcool e câncer bucal – revisão de estudos epidemiológicos. Periodontia. 2007;17(4):7-12.

Autor para correspondência:

Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti
dralessandro@ibest.com.br

Recebido: 12/08/2009

Aceito: 26/10/2009