

Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*

Lilian Eiko MAEKAWA^a, Fernanda Lourenção BRIGHENTI^b, Roberta LAMPING^b,
Luciane Dias de OLIVEIRA^b, Sidney MARCACCI^c, Cristiane Yumi KOGA-ITO^b

^aMestre em Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

^bDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

^cCirurgião-dentista, Faculdade de Odontologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

Maekawa LE, Brighenti FL, Lamping R, Oliveira LD, Marcacci S, Koga-Ito CY. Antimicrobial activity of alcohol-free chlorhexidine mouthwashes on *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP. 2010; 39(1): 15-19.

Resumo

A proposta deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais, à base de clorexidina, sem álcool na sua composição, sobre *Candida albicans*. Foram avaliados vinte isolados clínicos de *C. albicans* e uma cepa de referência (ATCC 18804) frente a dois enxaguatórios à base de digluconato de clorexidina 0,12% e sem etanol (“Ca” e “Or”), em comparação ao enxaguatório de gluconato de clorexidina com etanol (controle positivo). A máxima diluição inibitória (MDI) e a máxima diluição fungicida (MDF) foram determinadas pelo método de microdiluição. Foram realizadas 12 diluições seriadas dos produtos (de 50 a 0,02%) em duplicata. Em seguida, foram acrescentados 100 µL da suspensão de *C. albicans* (10^6 células.mL⁻¹) nos poços das placas. Após incubação (37 °C/24 horas), a MDI foi determinada por meio da leitura das densidades ópticas. Para determinar a MDF, foram realizadas semeaduras do conteúdo dos poços em ágar Sabouraud. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos Or e controle para a MDI, mas o grupo Ca mostrou uma MDI estatisticamente maior (Kruskal-Wallis, $p = 0,0012$). Já para MDF, não houve diferenças estatísticas entre os grupos Ca e controle (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,1631$). Pode-se concluir que o grupo Ca apresentou atividade fungicida sobre *C. albicans* semelhante ao controle, mas menor ação fungistática em comparação ao controle, enquanto que o Or apresentou apenas ação fungistática semelhante ao controle sobre os isolados avaliados.

Palavras-chave: Antimicóticos; antissépticos bucais; *Candida albicans*; clorexidina.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of alcohol-free mouthwashes on *Candida albicans*. Twenty clinical isolates of *C. albicans* and one reference strain (ATCC 18804) were evaluated after exposure to two 0.12% chlorhexidine-based and alcohol-free (“Ca” and “Or”) in comparison to gluconate chlorhexidine with ethanol (positive control). The maximum inhibitory dilution (MID) and maximum fugal dilution (MFD) were determined by the microdilution method. Twelve serial dilutions (from 50 to 0.02%) were prepared in duplicate. Then, 100 µL of *C. albicans* suspension (10^6 cells.mL⁻¹) were added to the wells. After incubation (37 °C/24 hours), MID was determined by reading the optical density. For MFD determination, the content of the wells were plated on Saouraud agar. For MID, there were no differences between groups Or and control, but Ca group showed a MID statistically higher (Kruskal-Wallis, $p = 0.0012$). For MFD, there were no differences between Ca and control (Mann-Whitney test, $p = 0.1631$). It can be concluded that Ca group showed a fungicid activity against *C. albicans* similar to the control, but lower fungistatic activity when compared to the control. Group Or showed only a fungistatic action similar to control.

Keywords: Antifungal agents; mouthwashes; *Candida albicans*; chlorhexidine.

INTRODUÇÃO

Diversas doenças bucais estão associadas ao acúmulo do biofilme bucal, como cárie, doença periodontal e infecções por *Candida* spp.¹ Assim, o controle do acúmulo do biofilme é um fator importante para a manutenção da saúde bucal.

As leveduras do gênero *Candida* estão presentes em 25 a 50% de pacientes saudáveis de maneira assintomática.² No entanto, pacientes HIV positivos, diabéticos, oncológicos ou transplantados estão mais propensos a desenvolver infecções por esses microorganismos. A candidose bucal é altamente prevalente em pacientes imunocomprometidos ou que fazem uso de prótese total.³ Além disso, as espécies de *Candida* estão entre os microorganismos que mais causam infecções nosocomiais.²

A forma mais comum de candidose oral é a candidose associada à estomatite protética, que está presente em cerca de 75% dos usuários de prótese total.⁴ A incidência de infecções por *Candida* spp. também aumentou nas últimas décadas como consequência do aumento no número de pacientes imunocomprometidos. Nesses casos, a infecção por *Candida* spp. é normalmente causada por uma cepa residente, sendo, portanto, uma infecção oportunista.^{5,6}

Frequentemente, a atenção à causa primária de infecções fúngicas irá eliminar a necessidade de tratamentos prolongados.⁷ O método mais importante para prevenção da candidose é minimizar ou eliminar fatores predisponentes,⁸ que incluem o controle dos microorganismos não somente nas mucosas, mas também em superfícies inanimadas, como próteses totais, para evitar uma reinfecção.⁹ Para os pacientes resistentes a essa terapêutica, a clorexidina tem sido sugerida como uma alternativa aos antifúngicos convencionais no tratamento e na prevenção da candidose oral.¹⁰

A disponibilidade de enxaguatórios bucais contendo diferentes ingredientes ativos – como óleos essenciais, clorexidina e cloreto de cetilperidíneo – é grande. A maioria deles contém entre 5 e 25% de álcool, que é utilizado para estabilizar e dissolver os ingredientes ativos, proporcionar uma sensação refrescante, aumentar o prazo de validade e prevenir a contaminação por microorganismos.¹¹

No entanto, algumas preocupações têm sido levantadas acerca dos possíveis efeitos colaterais na cavidade bucal devido ao uso prolongado de colutórios contendo álcool. O uso desses produtos é desaconselhável em crianças, gestantes, lactantes, diabéticos, alcoólicos, pacientes que usam metronidazol, pacientes com xerostomia, membros de algumas religiões, pacientes com mucosite ou que estão sob radioterapia de cabeça e pescoço e pacientes imunocomprometidos. Alguns destes quadros são condições predisponentes para o aparecimento de candidoses.¹²⁻¹⁵

Essas desvantagens levaram ao desenvolvimento de produtos alternativos, sem álcool na sua composição. No entanto, é necessário que esses produtos tenham sua eficácia mantida em relação à formulação convencional. Considerando-se que a eficácia de enxaguatórios sem álcool contra leveduras ainda não foi testada, a proposta deste estudo foi avaliar a atividade

antimicrobiana de novos enxaguatórios bucais sem álcool à base de digluconato de clorexidina sobre isolados de *Candida albicans*.

MATERIAL E MÉTODO

1. Isolados e Condições de Crescimento

Vinte isolados clínicos de *C. albicans* provenientes de pacientes com estomatite protética foram selecionados ao acaso a partir de amostras antigas da coleção pertencente ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.¹⁶ Todos os pacientes incluídos no estudo tinham entre 37 e 55 anos de idade e não apresentavam nenhuma alteração sistêmica, não eram usuários de medicamentos antidepressivos e não haviam sido submetidos a tratamento com antibióticos por no mínimo seis meses antes da coleta da saliva. Também foi utilizada uma cepa de referência de *C. albicans* (ATCC 18804) para efeitos de comparação com os isolados clínicos. Os isolados foram mantidos em coleção e congelados em YPD (extrato de levedura, 1 g; dextrose 2 g; peptona, 2 g; água destilada, 100 mL) acrescido de 5% de glicerol.

Os isolados de *Candida* spp. foram obtidos da saliva total estimulada utilizando-se ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) suplementado com cloranfenicol (0,1 mg.mL⁻¹) e foram identificados por meio dos seguintes testes: formação de tubos germinativos, presença de hifas ou pseudohifas, produção de clamidósporos, fermentação e assimilação de carboidratos, segundo Sandvén et al.¹⁷ Os isolados foram transferidos para ágar Sabouraud dextrose e estocados a 4 °C.

2. Determinação da Máxima Diluição Inibitória (MDI) e a Máxima Diluição Fungicida (MDF)

A atividade antifúngica foi determinada pelo método de microdiluição. Os isolados de *Candida* spp. foram repicados em ágar Sabouraud dextrose (Difco Co., Detroit, MI, EUA) e incubados a 37 °C por 24 horas. Suspensões padronizadas de 10⁶ células.mL⁻¹ em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) foram obtidas com auxílio de espectrofotometria (Micronal B – 582, $\lambda = 595$ nm, DO = 0,284).

Dois enxaguatórios bucais sem etanol em sua composição foram analisados: Cariax (Ca), formulado com digluconato de clorexidina 0,12%, fluoreto de sódio 0,05% (PharmaKIN Comércio de Cosméticos Ltda, São Paulo-SP, Brasil) e Orthokin (Or), composto por digluconato de clorexidina 0,06%, fluoreto de sódio 0,05% e acetato de zinco 0,34% (PharmaKIN Comércio de Cosméticos Ltda, São Paulo-SP, Brasil), em comparação a um enxaguatório com etanol, o Periogard, à base de gluconato de clorexidina 0,12% (Colgate Palmolive Ltda, São Paulo-SP, Brasil), que foi utilizado como controle positivo.

Foram realizadas 12 diluições seriadas dos produtos nas concentrações de 50 a 0,02% em RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (HIMEDIA, Mumbai, Índia) tamponado com ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹, pH 7,0) (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, EUA),

Em outro estudo clínico, Quirynen et al.²⁵ avaliaram diferentes soluções de clorexidina com ou sem adição de álcool. Durante 11 dias, voluntários bochecharam duas vezes ao dia as soluções e permaneceram sem realizar o controle mecânico do biofilme. Os resultados mostraram que 15 mL da clorexidina 0,12% com álcool ou 15 mL da clorexidina 0,12% associada a cloreto de cetilperidíneo 0,05% são tão eficientes quanto o uso de 10 mL de clorexidina 0,2% com álcool. Os Autores destacam ainda que a formulação sem álcool oferece vantagens, como menor irritação aos tecidos bucais, possibilidade de uso em pacientes com mucosite ou com ulcerações bucais recorrentes e melhoria do odor do hálito. O sabor mais agradável da solução de clorexidina sem álcool também tem sido relatado como uma vantagem adicional desse produto.¹³

Em uma avaliação *in vitro* e *in vivo* de quatro formulações, Herrera et al.²⁶ demonstraram que a solução de clorexidina 0,12% com álcool foi mais ativa do que as que não continham álcool, com exceção da formulação que combinava clorexidina 0,12% com cloreto de cetilperidíneo 0,05%. Para os testes *in vitro*, foram utilizadas vinte diferentes espécies de bactérias encontradas no biofilme bucal. Algumas dessas bactérias estão associadas com gengivite, periodontite ou cárie; outras são comensais, oportunistas ou patógenos em potencial. Para os testes *in vivo*, a saliva de dez voluntários foi avaliada após bochecho por 1 minuto com os enxagatatórios.

No presente estudo, o enxagatatório Orthokin apresentou uma atividade fungistática semelhante àquela do grupo controle (Periogard). De acordo com o fabricante, o Orthokin é o primeiro enxagatatório destinado especificamente para pacientes que utilizam aparelhos ortodônticos. A combinação da clorexidina com o acetato de zinco pode produzir um sinergismo que potencializaria a ação antisséptica, exercendo um efeito bacteriostático prolongado. No entanto, não há dados na literatura que comprovem as vantagens dessa combinação, como demonstrado no estudo de Giertsen et al.,²⁷ segundo o qual a adição de íons zinco não aumentou a eficácia anticárie da clorexidina em ratos parcialmente dessalivados. A concentração de clorexidina nesse produto (0,06%) é menor que a encontrada normalmente, o que provavelmente colaborou para a ausência de atividade fungicida observada no presente estudo.

Por outro lado, a atividade fungicida do Cariax – embora tenha apresentado valores de MDI maiores do que o controle –

não diferiu da apresentada pelo grupo controle. Esse produto não possui álcool na sua formulação, sendo, portanto, mais indicado para uma maior variedade de pacientes.

Apesar da grande eficácia, a clorexidina pode trazer efeitos colaterais que limitam o uso prolongado desse antisséptico, como, por exemplos, manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, disgeusia e descamação da mucosa bucal.²⁸ Particularmente, o manchamento dos dentes é a principal queixa dentre os pacientes dentados,²⁹ mas o manchamento das próteses também pode se tornar um problema para os pacientes acometidos pela estomatite protética. Budtz-Jørgensen, Løe³⁰ demonstraram que a imersão diária em clorexidina a 2% por 15 segundos durante 15 dias produziu alteração de cor no epitélio da língua e causou manchamento nas próteses totais desses pacientes. Assim, cirurgiões-dentistas devem recomendar aos pacientes fazer uso racional da clorexidina, evitando seu uso por longos períodos de tempo.

O uso do álcool como veículo para soluções de clorexidina ainda é muito discutido. A maioria dos estudos realizados com enxagatatórios sem álcool, ao contrário do presente estudo, apresenta resultados inconclusivos, pois não utilizaram um controle positivo para efeitos de comparação. No entanto, ainda são necessários estudos *in vitro* utilizando-se modelos de biofilme de *Candida* spp. e de espécies múltiplas; e estudos *in vivo*, utilizando a população alvo, devem ser realizados para que esses produtos possam ser utilizados com segurança e com a mesma eficácia dos produtos de formulação convencional.

Segundo Neppelenbroek et al.,³¹ a identificação definitiva de *C. dubliniensis* deve ser feita por métodos moleculares. No presente estudo utilizou-se o método de identificação fenotípica, que não é capaz de diferenciar as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, o que pode ser considerado uma limitação do presente estudo.

Pode-se concluir que o Cariax apresentou atividade fungicida sobre *C. albicans* semelhante à do Periogard, mas menor ação fungistática em comparação ao controle; notou-se, também que o Orthokin apresentou apenas ação fungistática semelhante ao Periogard sobre os isolados avaliados. Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos neste estudo, é possível sugerir que o uso de colutórios bucais sem álcool ainda é restrito aos casos em que há contraindicação dos produtos convencionais.

REFERÊNCIAS

1. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3): CD002284.
2. Bahna P, Hanna HA, Dvorak T, Vaporciyan A, Chambers M, Raad I. Antiseptic effect of a novel alcohol-free mouthwash: a convenient prophylactic alternative for high-risk patients. *Oral Oncol.* 2007;43:159-64.
3. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998;43:45-50.
4. Penha SS, Birman EG, Silveira FRX, Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. *Pesqui Odontol Bras.* 2000;14:119-22.
5. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. *J Infect Dis.* 1993;168:463-6.

6. Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN. Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol.* 1994;32:975-80.
7. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994;5:125-57.
8. Lortholary O, Dupont B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:477-504.
9. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:172-98.
10. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;87:44-9.
11. Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% cetylpyridinium chloride/ 0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2005;32:390-400.
12. Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, et al. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent.* 2005; 18 (special issue): 9A-14A.
13. van Strydonck DAC, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 2005;32:305-9.
14. Witt J, Walters P, Bsoul S, Gibb R, Dunavent J, Putt M. Comparative clinical trial of two antigingivitis mouthrinses. *Am J Dent.* 2005;18(special issue): 15A-17A.
15. White DJ. An alcohol-free therapeutic mouthrinse with cetylpyridinium chloride (CPC) – The latest advance in preventive care: crest pro-health rinse. *Am J Dent.* 2005;18(special issue): 3A-8A.
16. Koga, CY. Quantificação da microbiota cariogênica e fúngica de anticorpos anti-*Candida* e anti-*Streptococcus mutans* na saliva de pacientes respiradores bucais. [tese doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 1995.
17. Sandvén P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand.* 1990;48:27-36.
18. Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987;14:217-27.
19. Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1999;13:343-8.
20. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986;112:863-9.
21. Epstein JB. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69:32-41.
22. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngol Clin North Am.* 1993;26:1069-89.
23. Ferretti GA, Brown AT, Raybould TP, Lillich TT. Oral antimicrobial agents - chlorhexidine. *NCI Monogr.* 1990;9:51-5.
24. Arweiler NB, Netuschil L, Reich E. Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2001;28:168-74.
25. Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, van Steenberghe D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2001;28:1127-36.
26. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol.* 2003;30:307-14.
27. Giertsen E, Bowen WH, Pearson SK. Combined effects of Zn(2+)-chlorhexidine and Zn(2+)-cetylpyridinium chloride on caries incidence in partially desalivated rats. *Scand J Dent Res.* 1991;99:301-9.
28. Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. *J Periodontol.* 2003;74:1647-51.
29. Albandar JM, Gjermo P, Preus HR. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. *J Periodontol.* 1994;65:109-12.
30. Budtz-Jørgensen E, Løe H. Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1972;80:457-64.
31. Neppelenbroek KH, Campanha NH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* 2006;12:242-53.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

e-mail: cristiane@fosjc.unesp.br

Recebido: 15/12/2008

Aceito: 22/02/2010

