

# Atividade Antifúngica de Antissépticos Bucais sobre *Candida* spp.

## Antifungal Activity of Mouthwashes on *Candida* spp.

ANA LUÍZA ALVES DE LIMA PÉREZ<sup>1</sup>  
ANDREIA MEDEIROS RODRIGUES CARDOSO<sup>1</sup>  
YURI WANDERLEY CAVALCANTI<sup>1</sup>  
LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS ALMEIDA<sup>2</sup>  
WILTON WILNEY NASCIMENTO PADILHA<sup>3</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Verificar a atividade antifúngica *in vitro* dos antissépticos bucais Malvatricim® (P1), Colgate Plax® (P2), Oral B® (P3), Colgate Periogard® (P4) sobre *Candida albicans* (ATCC 40277), *Candida albicans* (ATCC 289065), *Candida krusei* (ATCC 40147), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida tropicalis* (ATCC 40042). **Material e Método:** Foram confeccionadas suspensões fúngicas (concentração de 10<sup>6</sup> microrganismos/mL), as quais foram semeadas em placas com Ágar Sabouraud Dextrose 4%. Realizou-se o teste de difusão em ágar, utilizando-se a metodologia dos poços, nos quais foram inseridos 50µL dos produtos em sua formulação comercial. Como controle positivo, utilizou-se a Nistatina 1:100.000 UI (P5). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h. Os testes foram realizados em triplicata e comparados ao controle positivo. O diâmetro médio dos halos de inibição do crescimento (DMIC) produzidos pelas substâncias foi calculado e representou a ação antimicrobiana. **Resultado:** Frente a *C. albicans* (ATCC-289065), *C. krusei* (ATCC-40147), *C. tropicalis* (ATCC-40042), e *C. tropicalis* (ATCC-13803) o P4 teve melhor atuação com DMIC de 15,0mm; 15,0mm, 18,0mm e 14,3mm, respectivamente. A cepa de *C. albicans* (ATCC-40277) foi a única susceptível a P1 (DMIC=25,3mm) e resistente a P5. Os colutórios P2, P3 e P4 apresentaram atividade antimicrobiana sobre todas as cepas testadas. **Conclusão:** Concluiu-se que os produtos testados, a exceção do Malvatricim®, apresentaram atividade inibitória sobre todas as cepas analisadas. O Colgate Periogard® apresentou melhor atividade diante das cepas investigadas, seguido por Colgate Plax®, Oral B® e Malvatricim®.

### DESCRIPTORIOS

Profilaxia dentária. Microbiologia. Fungos.

### ABSTRACT

**Objective:** To verify the *in vitro* antifungal activity of the mouthwashes Malvatricim® (P1), Colgate Plax® (P2), Oral B® (P3) and Colgate Periogard® (P4) on *Candida albicans* (ATCC 40277), *Candida albicans* (ATCC 289065), *Candida krusei* (ATCC 40147), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) and *Candida tropicalis* (ATCC 40042). **Material and Methods:** Fungal suspensions were prepared (10<sup>6</sup> microorganisms / mL) and seeded on Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar 4%. It was followed the agar diffusion method by means of the Wells technique. Into each well were inserted 50 µL of the products as in their commercial formulation. Nystatin 1:100.000 IU (P5) was used as positive control. The plates were incubated in bacteriological incubator at 37°C for 48h. Tests were performed in triplicate and compared to positive control. The mean diameter of growth inhibition halos (MDGI) promoted by the substances was calculated and represented the antimicrobial activity. **Results:** P4 has showed the most potent activity against *C. albicans* (ATCC-289065), *C. krusei* (ATCC-40147), *C. tropicalis* (ATCC-40042), and *C. tropicalis* (ATCC-13803), with MDGI of 15.0mm; 15.0mm; 18.0mm and 14.3mm, respectively. *C. albicans* strain (ATCC-40277) was the only one susceptible to P1 (MDGI=25.3mm) and resistant to P5. The mouthwashes P2, P3 and P4 have presented antimicrobial activity against all strains assessed. **Conclusion:** It is concluded that the products under study, excepting Malvatricim®, have showed inhibitory activity on all strains assayed. Colgate Periogard® has presented the best activity on the strains investigated, followed by Colgate Plax®, Oral B® and Malvatricim®.

### DESCRIPTORS

Dental prophylaxis. Microbiology. Fungi.

1 Alun(o)a de Graduação em Odontologia – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba.

2 Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Mestrado em Odontologia Preventiva e Infantil - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba

3 Professor Doutor Titular de Clínica Integrada – Departamento de Clínica e Odontologia Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

A candidose oral é uma infecção oportunista que, geralmente, acomete indivíduos imunocomprometidos, sendo a *Candida albicans* a espécie mais associada à infecção (CORRÊA, ANDRADE, 2006). A existência de *Candida spp.* na cavidade oral é verificada em razão desses microrganismos constituírem leveduras pertencentes à microbiota normal do homem. Diante de um desequilíbrio microbiano, podem ser desenvolvidas infecções que estão associadas a fatores tais como: diminuição da imunidade, distúrbios endócrinos, lesões de tecidos moles, má higiene oral, terapia medicamentosa, entre outros. Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando um aumento expressivo. Vários fatores estão relacionados ao crescimento dessas infecções fúngicas, entre eles: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o emprego de medicamentos imunossupressores, utilizados às vezes de forma abusiva, permitindo a instalação de microrganismos convencionalmente saprófitos (SIDRIM *et al.*, 1999).

Quando o processo infeccioso da cavidade oral estiver instalado, o profissional deverá incorporar medidas de controle químico e mecânico dos nichos microbianos na tentativa de alcançar o equilíbrio da microbiota rapidamente, justificando assim o uso de antimicrobianos (FERES, 2010; NAVAS *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2008).

Há diferentes formulações comerciais para a administração de antimicrobianos na cavidade oral, a exemplo de géis, dentifrícios, as pastilhas, chicletes e colutórios ou antissépticos bucais (FERRARINI *et al.*, 2007). Os colutórios, por apresentarem componentes antimicrobianos, são considerados medidas complementares ao controle mecânico, sendo necessária indicação para uso. No mercado, estão disponíveis formulações efetivas ao controle microbiano, tais como a base de clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo, óleos essenciais, fluoreto estanhoso, e triclosan (FERES, 2010).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi verificar a atividade antifúngica *in vitro* dos antissépticos bucais Malvatricim®, Colgate Plax®, Oral B®, Colgate Periogard® sobre os microrganismos *Candida*

*albicans* (ATCC-40277), *Candida albicans* (ATCC-289065), *Candida krusei* (ATCC-40147), *Candida tropicalis* (ATCC-13803) e *Candida tropicalis* (ATCC-40042).

## METODOLOGIA

Utilizou-se uma abordagem indutiva, com procedimento comparativo-estatístico e técnica de documentação direta em laboratório (LAKATOS, MARCONI, 2009).

Os antissépticos bucais utilizados foram: Malvatricim®, Colgate Plax®, Oral B®, Colgate Periogard® (Quadro 1). Como controle positivo, utilizou-se suspensão oral de Nistatina (1:100.000 UI), disponível em formulação comercial.

Esses produtos tiveram sua ação antimicrobiana testada sobre os microrganismos:

- *Candida albicans* (ATCC-40277);
- *Candida albicans* (ATCC-289065);
- *Candida krusei* (ATCC-40147);
- *Candida tropicalis* (ATCC-13803); e
- *Candida tropicalis* (ATCC-40042).

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando a técnica dos poços (ALVES *et al.*, 2006). Foram preparadas 15 placas de petri com meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose 4% (DIFCO). Foram realizadas suspensões dos microrganismos-testes em solução salina, de acordo com a Escala de MacFarland ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, as placas de Petri foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis.

Em cada placa foram confeccionados cinco poços de 6mm de diâmetro, no qual foram inseridos 50µL dos produtos em sua formulação comercial. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h.

Para coleta de dados, mensuraram-se os halos de inibição do crescimento fúngico com auxílio de um paquímetro manual e, em seguida, calculou-se o diâmetro médio dos halos de inibição do crescimento (DMIC) produzidos pelas substâncias. Os testes foram realizados em triplicata.

**Quadro 1.** Especificações dos antissépticos bucais utilizados.

Produtos	Composto ativo
Malvatricim® (P1)	Tintura de <i>Malva sylvestris</i> e Triclosan
Colgate Plax® (P2)	Cloreto de cetilpiridínio
Oral B® (P3)	Cloreto de cetilpiridínio
Colgate Periogard® (P4)	Gluconato de Clorexidina

## RESULTADOS

Os resultados do teste de difusão em meio sólido estão apresentados na Tabela 1. A visualização dos halos de inibição do crescimento é ilustrada pela Figura 1 (*C. albicans* - ATCC-289065).

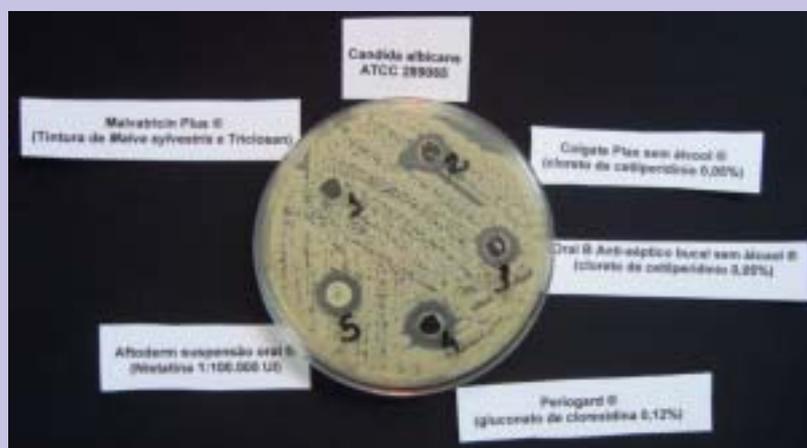
## DISCUSSÃO

A metodologia de difusão em ágar empregada é validada por outros estudos, os quais também avaliaram a atividade antimicrobiana de formulações comerciais ou de produtos naturais (DRUMOND *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2009). Porém, o presente estudo apresenta limitações no sentido que as propriedades físico-químicas dos produtos podem influenciar a difusão dos mesmos no meio de cultura e, dessa forma, interferir nos resultados da avaliação antimicrobiana (NASCIMENTO *et al.*, 2007; OSTROSKY *et al.*, 2008).

O triclosan, composto ativo do Malvatricim®, é efetivo contra microrganismos gram-positivos, gram-negativos, fungos e bolores. Apresenta atividade bactericida com um amplo espectro de ação quando em altas dosagens, ajudando a impedir a propagação dos microrganismos e reduzindo o risco de infecções (GIARETTA *et al.*, 2007). O cloreto de cetilpiridínio, presente no Colgate Plax® e Oral B®, é uma amônia quaternária, composta por um anel alifático. Devido a sua ligação às glicoproteínas da cavidade oral, ele demonstra uma atividade prolongada, cobrindo o dente e a mucosa oral e sua atividade antimicrobiana é de largo espectro, causando a interrupção do metabolismo, crescimento celular e morte celular (ROCHA *et al.*, 2008). A clorexidina, encontrado no Colgate Periogard®, é um diguano-hexano e por apresentar uma potente atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos é considerada o quimioterápico-padrão (ROCHA *et al.*, 2008). Além de ser eficiente em baixas concentrações e possuir substantividade, prolongando assim, sua ação terapêutica (MAEKAWA *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento das cepas avaliadas (em mm) produzidos pelos produtos testados.

Microrganismos	P1 (Malvatricim®)	P2 (Colgate Plax®)	P3 (Oral B®)	P4 (Colgate Periogard®)	P5 (Nistatina (1:100.000 UI) -Controle Positivo)
<i>Candida albicans</i> (ATCC-289065)	0	12	12,6	15	14
<i>Candida albicans</i> (ATCC-40277)	25,3	16,6	17,3	19,3	0
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC-40042)	0	12,3	13	18	13,3
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC-13803)	0	12,3	12,6	14,3	12,6
<i>Candida krusei</i> (ATCC-40147)	0	13,6	10	15	10



**Figura 1:** Halos de inibição do crescimento de *C. albicans* (ATCC-289065) produzidos pelas substâncias testadas.

Além da *C. albicans* outras espécies como *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* podem estar envolvidas na etiologia da candidose oral (TEN-CATE *et al.*, 2009). Assim, a avaliação da atividade antimicrobiana dos colutórios diante dos microrganismos envolvidos neste estudo é relevante ao controle químico de *Candida*.

Diante da utilização de alguns medicamentos antifúngicos, as espécies de *Candida* têm se mostrado resistentes (CROCCO *et al.*, 2004; KURIYAMA *et al.*, 2005). No presente estudo foi verificada ausência de atividade antifúngica da Nistatina sobre a cepa de *Candida albicans* (ATCC-40277), o que sugere resistência dessa cepa ao controle positivo. Destaca-se a necessidade de desenvolver produtos alternativos para o controle da candidose oral.

No estudo de CAVALCANTI *et al.* (2009), foi avaliada a atividade antifúngica de antissépticos bucais sobre cepas de *Candida*, sendo verificada ausência de atividade antifúngica da Nistatina sobre *C. krusei* (ATCC-6538). No estudo de PEREIRA *et al.* (2009) foi observado resistência de cepas de *Candida* spp., isoladas de animais, ao fluconazol (antifúngico sintético).

Dessa forma, verifica-se que as cepas clínicas e padrão de *Candida* podem ser resistentes a antifúngicos sintéticos, mesmo quando estes são considerados padrão-ouro. Diante dos resultados encontrados neste estudo – resistência para a Nistatina e sensibilidade para o Malvatricim® - o teste foi realizado pela segunda vez em triplicata com a mesma cepa, sendo observados os mesmos resultados.

Com exceção do Malvatricim®, os antissépticos bucais inibiram o crescimento dos microrganismos testados, destacando-se o Colgate Periogard® que, quando em contato com todas as cepas avaliadas no estudo, promoveu a formação de halos de inibição maiores que os do controle positivo (Nistatina).

Assim, os resultados deste estudo corroboram os achados de BUGNO *et al.* (2006), na medida em que

os produtos que mostraram melhor atividade antifúngica foram os que apresentaram como princípio ativo o gluconato de clorexidina, seguido dos compostos por cloreto de cetilpiridínio.

O estudo de CAVALCANTI *et al.* (2009) avaliou a atividade antifúngica de colutórios sobre *C. krusei* (ATCC-6538) e *C. tropicalis* (ATCC 13803). Diferentemente do presente estudo, os produtos Oral-B® e Colgate Plax Overnight® apresentaram atividade antimicrobiana superior ao Colgate Periogard®. Justifica-se, para tanto, a diferença no componente ativo desses produtos (cloreto de cetilpiridíneo e gluconato de colexidina), o que representa diferença de resposta entre os microrganismos restados.

O Malvatricim® apresentou ação antifúngica apenas sobre a *C. albicans* (ATCC-40277), produzindo um halo de inibição expressivo diante dos outros colutórios. Esse mesmo microrganismo apresentou-se resistente à Nistatina e seu resultado diferenciado pode justificar os resultados para esse antisséptico.

Ressalta-se a importância da utilização dos antissépticos bucais sob prescrição do cirurgião-dentista, com o objetivo de evitar o uso indiscriminado, e o desenvolvimento de resistência e alterações microbianas (FERES, 2010). Os colutórios destacam-se como alternativa para o controle químico de fungos da cavidade oral, sendo sugerido o desenvolvimento de novos produtos capazes de suprir as demandas clínicas.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que os produtos testados, a exceção do Malvatricim®, apresentaram atividade inibitória sobre todas as cepas analisadas. O Colgate Periogard® apresentou melhor atividade diante das cepas investigadas, seguido por Colgate Plax®, Oral B® e Malvatricim®.

## Referências

- ALVES PM, LEITE PHAS, PEREIRA JV, PEREIRA LF, PEREIRA MSV, HIGINO JS, LIMA EO. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. *Rev Bras Farmacogn*. 16 (2): 192-196, 2006.
- BUGNOA, NICOLETTI MA, ALMODÓVAR AAB, PEREIRA TC, AURICCHIO MT. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 65 (1): 40-45, 2006.
- CAVALCANTI AL, MENESES RO, DA SILVA KS, SÁ SCVL, ALMEIDA LFD, CASTRO RD. Atividade antifúngica *in vitro* de enxaguatórios bucais sobre *Candida* spp. *Rev Odontol UNESP*. 38 (5): 313-317, 2009.
- CORRÊA EM, ANDRADE ED. Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. *Rev Odontol Cienc*. 20 (49): 281-289, 2006.
- COSTA EMMB, ESMERALDO MRA, CARVALHO MGF, DANIEL RLDA, PASTRO MF, SILVA-JÚNIOR FL. Avaliação da Ação Antimicrobiana da Própolis e de Substâncias Utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 8 (1): 21-25, 2008.
- CROCCO EI, MIMICALMJ, MURAMATU LH, GARCIA C, SOUZA VM, RUIZ LRB, ZAITZ C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An Bras Dermatol*. 79 (6): 689-697, 2004.
- DRUMOND MRS, CASTRO RD, ALMEIDA RVD, PEREIRA MSV, PADILHA WWN. Estudo Comparativo *in vitro* da Atividade Antibacteriana de Produtos Fitoterápicos Sobre Bactérias Cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 4 (1): 33-38, 2004.
- FERES M. Controle diário do Biofilme com antissépticos – Uma visão atual para a prática clínica. Enxaguatórios o dia a dia do dentista. *Rev ABO Nac*. 18: 3-8, 2010.
- FERRARINI M, BABYAR, 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*. 26 (4): 541-547, 2007.
- GIARETTA J, SANTOS TGB, NASCIMENTO IA, MATTAR, GOMES MF, GAZIM ZC. Comparação da atividade antimicrobiana dos sabonetes contendo digluconato de clorexidina, triclosan e óleo essencial de achillea millefolium. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*. 11 (1):27-32, 2007.
- KURIYAMAT, WILLIAMS DW, BAGG J, COULTER WA, READY D, LEWIS MA. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 20 (6):349-353, 2005.
- LAKATOS EM, MARCONI MA. *Fundamentos da Metodologia Científica*. São Paulo: Atlas; 2009.
- MAEKAWA LE, BRIGHENTI FL, LAMPING R, OLIVEIRA LD, MARCACCI S, KOGA-ITO CY. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*. 39 (1):15-19, 2010.
- MENEZES MM, OLIVEIRA LD, KOGA-ITO CY, JORGE AOC, VALERA MC. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. *Cienc Odontol Bras*. 11 (2):23-28, 2008.
- NASCIMENTO PFC, NASCIMENTO AC, RODRIGUES CS, ANTONIOLLIAR, SANTOS PO, BARBOSA-JÚNIOR AM, TRINDADE RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*. 17 (1):108-113, 2007.
- NAVAS EAFA, INOCÊNCIO AC, JORGE AOC, KOGA-ITO CY. Avaliação da utilização de limpador de língua na redução dos níveis de leveduras na cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP*. 38 (2):99-103, 2009.
- OSTROSKY EA, MIZUMOTO MK, LIMA MEL, KANEKO TM, NISHIKAWA SO, FREITAS BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*. 18 (2):301-307, 2008.
- PEREIRA AV, RODRIGUES OG, LOBO KMS, BEZERRA DAC, MOTARA, COUTINHO LCA, SILVA LBG, ATHAYDE ACR. Atividade anti-fúngica do neem e jurema-preta sobre cepas de *Candida* spp isolados de vacas com mastite subclínica no Estado de Pernambuco. *Rev Bras Farmacogn*. 19 (4):818-822, 2009.
- ROCHA ARA, SOARES CL, PEREIRA SLS, ROCHA MMNP. Efeito de diferentes agentes químicos sobre microrganismos de biofilme supragengival: estudo experimental *in vitro*. *UFES Rev Odontol*. 10 (2):27-30, 2008.
- SIDRIM JJC, DIÓGENES MJN, PAIXÃO GC. Dermatofitose. In: SIDRIM, JJC, MOREIRA JLB. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 108-131

21. TEN-CATE JM, KLIS FM, PEREIRA-CENCI T, CRIELAARD W, GROOT PWJ. Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to Candida Biofilm Formation. *J Dent Res.* 88 (2):105-115, 2009.

**CORRESPONDÊNCIA**

Ana Luíza Alves de Lima Pérez  
Rua General Renato Ribeiro de Morais, 38. Bairro dos  
Estados. João Pessoa - Paraíba - Brasil. CEP: 58030-229

**E-mail**

analuiza\_perez@yahoo.com.br