AÇÃO ANTIFÚNGICA DE ANTISSÉPTICOS EM ISOLADOS DE CANDIDA SPP DA CAVIDADE BUCAL

Letícia Dobis Telles (PIBIC), Elizabete Brasil dos Santos (Pesquisadora), Luis Antonio Esmerino (Orientador), e-mail: esmerino@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Análises Clínicas

Área do conhecimento 4.03.00.00-5 Farmácia e subárea do conhecimento 2.12.00.00-9 Microbiologia.

Palavras-chave: *Candida* spp, antissépticos bucais, atividade antifúngica, biofilme.

Resumo

A candidíase é considerada a infecção micótica mais comum na cavidade oral, trata-se de uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Candida.* A *Candida spp* é um microrganismo comensal presente na cavidade oral de pessoas consideradas saudáveis, porém, em condições que favorecem seu crescimento pode se tornar patogênica ao homem. Para o estudo foram utilizadas 32 leveduras. O maior número de espécies foi observado para *Candida albicans* 20 (65,6%), seguido de *Candida krusei* 5 (15,6%), *Candida tropicalis* 4 (12,5%) e *Candida glabrata* 3 (9,4%). Os testes de atividade antifúngica e inibição da formação de biofilme foram realizados com 6 antissépticos bucais, todos apresentaram redução significativa no crescimento da levedura e no desenvolvimento do biofilme ($p<0,05$). O antifungigrama realizado com 3 antifúngicos diferentes demonstrou uma maior taxa de sensibilidade à anfotericina B 96% e resistência ao fluconazol (64%). Os antissépticos bucais podem ser considerados coadjuvantes importantes na prevenção da candidíase bucal.

Introdução

A candidíase é considerada a infecção micótica mais comum na cavidade bucal. Trata-se de uma infecção causada por leveduras do gênero *Candida*, microrganismo comensal presente na cavidade bucal de pessoas consideradas saudáveis, porém, em condições que favorecem seu crescimento pode se tornar patogênica ao homem. Alguns fatores podem favorecer o desenvolvimento da candidíase, como por exemplo: xerostomia, pacientes mantidos sob terapia imunossupressora, uso abusivo de antibióticos e corticosteroides, pacientes diabéticos, uso de aparelhos ortodônticos ou próteses dentárias, e em recém-natos visto que ainda não possuem mecanismos de defesa maduros e microbiota oral balanceada (SCHERMA *et al.*, 2004). O desenvolvimento da candidíase se inicia pela capacidade de adesão do microrganismo as células hospedeiras ou superfícies abióticas como próteses dentárias, podendo levar a formação de biofilme. O estudo de novas maneiras de prevenção e tratamento da candidíase se torna indispensável, visto que há um aumento nos casos de imunossupressão e consequentemente na incidência desta infecção. Os antissépticos bucais podem ser uma alternativa para a prevenção e tratamento da candidíase, podendo ser útil também para evitar a formação de biofilme. Os antissépticos bucais são geralmente empregados para auxiliar no combate aos microrganismos causadores de afecções bucais como cáries, formação

de placa, tártaro, gengivite, periodontite e até mesmo o mau hálito. A prevenção da candidíase oral pode ser realizada através da higienização da boca e do aparelho protético, incluindo a utilização de agentes químicos como antissépticos bucais. Considerando a importância clínica das infecções bucais provocadas por *Candida* spp, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica e a inibição da formação de biofilme por antissépticos bucais disponíveis no mercado, assim como determinar a susceptibilidade nas diferentes espécies de *Candida* spp frente a três agentes antifúngicos distintos.

Materiais e Métodos

No presente trabalho foram estudadas leveduras do gênero *Candida* cedidas pela Professora Dra. Elizabete Brasil dos Santos, departamento de Odontologia da UEPG. As leveduras foram coletadas ocasião da Pesquisa "Perfil de sensibilidade antimicrobiana de micro-organismos comumente isolados de biofilmes bucais após exposição aos Raios-X", parecer CEP 131.824. As espécies de *Candida* spp foram identificadas em Chromoagar. Após identificação realizou-se o antifungigrama das leveduras diluídas em solução salina estéril até atingir o padrão 0,5 na escala de McFarland (1,0-2,0 x 10^6 UFC/mL). Esta diluição foi semeada, com a utilização de um swab, em ágar Mueller-Hinton com 2% de glicose e posteriormente foram colocados discos de papel contendo antifúngicos ketoconazol, anfotericina B e fluconazol. Após incubação a 35°C por 24h em ar ambiente os halos de inibição foram determinados em milímetros (mm) para os critérios de "sensível", "intermediário" e "resistente". Foram considerados os pontos de corte estabelecidos pelo fabricante dos discos (Cecon®, São Paulo, Brasil).

As leveduras isoladas foram testadas quanto a ação antifúngica frente a 6 antissépticos comerciais com princípios ativos diferentes, os quais foram identificados por números: 1 - gluconato de clorexidina, 2 - thymol, 3 – cetilpiridínio, 4 - triclosan, 5 - tirotricina + hidroxinolina e 6 - peróxido de hidrogênio. Atividade antifúngica foi realizada pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM), adaptada de CLSI (2014), em microplaca de 96 cavidades com 170 microlitros de caldo Muller-Hinton com glicose 2%, 20 microlitros do antisséptico e 10 microlitros da levedura padrão 0,5 McFarland diluída 1:10. Após incubação 35 graus por 24 horas, a atividade antifúngica foi avaliada pela leitura da densidade óptica (DO) em leitor de placa de multidetecção híbrida Synergy™H1 com software Gen5.2. 630nm.

A produção e/ou inibição do biofilme foi realizada através da técnica da microplaca corada com cristal violeta 0,5% (STEPANOVIC *et al.*,2000). Para o preparo da placa utilizou-se a mesma técnica da CIM. Após incubação a 35°C por 24 horas o caldo com o crescimento microbiano foi aspirado das cavidades e estas foram lavadas e coradas. A atividade antibiofilme dos antissépticos bucais foi determinada em 570nm no leitor de placas. Para o cálculo foi feita a média das leituras descontando a média do branco correspondente. Para avaliação da atividade antimicrobiana e inibição do biofilme comparou-se as DO por análise estatística (ANOVA e pós teste Bonferroni, $p<0,05$, GraphPad Prism6). Para o cálculo da CIM a DO obtida com o crescimento das leveduras foi equivalente a 100% e o crescimento e/ou inibição das mesmas leveduras frente aos antissépticos foram proporcionalmente calculadas e foram consideradas sensíveis quando inibidas ≥90%.

Resultados e Discussão

No presente estudo 32 espécies de leveduras do gênero *Candida* spp foram isoladas da cavidade bucal. O maior número de espécies isoladas foi observado para *Candida albicans* 20 (65,6%), seguido de *Candida krusei* 5 (15,6%), *Candida tropicalis* 4 (12,5%) e *Candida glabrata* 3 (9,4%).

A análise estatística da atividade antifúngica dos diferentes antissépticos bucais foi realizada através da comparação do crescimento com antisséptico ao crescimento da mesma levedura sem o antisséptico. O resultado mostrou que houve diferença significativamente menor ($p<0,05$) com todos os antissépticos (Figura 1).

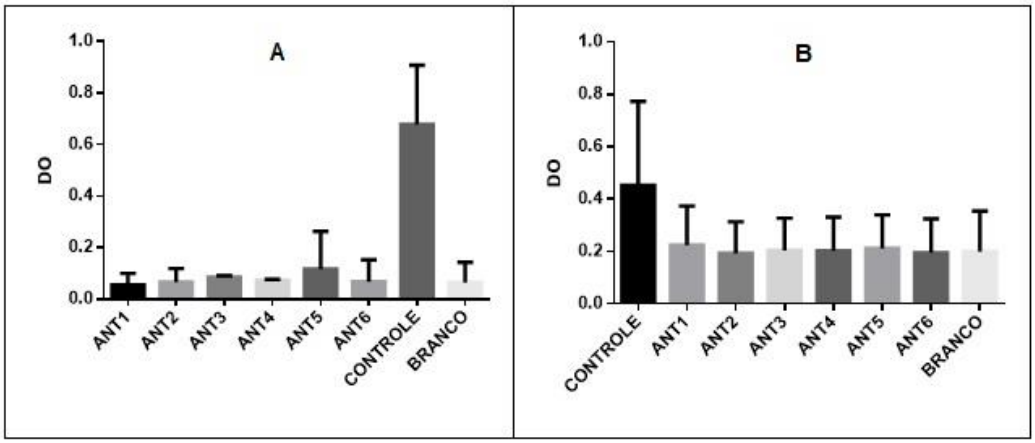


Figura 1. Ação dos antissépticos: 1A. Atividade antimicrobiana e 1B. Redução da formação do biofilme.

Os resultados obtidos demonstraram que o antisséptico 4, o qual possui o princípio ativo Triclosan, apresentou a maior inibição do crescimento da espécie *Candida albicans* e o antisséptico 5 referente ao princípio ativo Tirotricina + Hidroxinolina apresentou a menor sensibilidade, inibindo menos de 70% do crescimento. Quanto à espécie *Candida krusei*, o antisséptico com o princípio ativo timol apresentou a menor sensibilidade, inibindo apenas 40% do crescimento. O mesmo ocorreu para *Candida tropicalis*, sendo o timol o único antisséptico que não inibiu o crescimento desta espécie. Em um estudo in vitro, Moreira *et al*. (2009) evidenciaram a pouca eficácia do timol na atividade antimicrobiana. Para *Candida glabrata*, o antisséptico 5 com o princípio ativo tirotricina + hidroxinolina foi o único antisséptico testado que não apresentou inibição do crescimento de 100% dos isolados da espécie. O antifungigrama demonstrou, de maneira geral, que a anfotericina B foi o antifúngico que obteve melhor desempenho, apresentando uma taxa de sensibilidade de 96%. Demitto *et al.* (2012) e Althaus *et al.* (2015) também apresentaram em seus estudos uma alta taxa de sensibilidade de *Candida* spp à anfotericina B. Em contrapartida, o fluconazol demonstrou uma taxa de sensibilidade baixa, 64% dos isolados apresentaram resistência a este antifúngico. O uso prolongado e repetido deste fármaco pode ter dado origem ao desenvolvimento da resistência de *Candida* spp. A TABELA 1 mostra a interpretação do antifungigrama.

TABELA 1. Interpretação do resultado do antifungigrama para *Candida* spp.

Interpretação	Sensível %	Intermediário %	Resistente %
Cetoconazol	60	40	0
Anfotericina B	96	0	4
Fluconazol	36	0	64

A análise estatística da ação dos antissépticos bucais no controle do biofilme produzido pelos isolados de *Candida* spp mostrou que todos os antissépticos utilizados foram eficientes na sua redução, estatisticamente significante ($p<0,05$). A Figura 1 mostra a redução do biofilme em relação ao controle; que foi o biofilme formado pela mesma levedura sem o antisséptico.

Conclusões

O estudo demonstrou a importância do diagnóstico laboratorial da candidíase bucal para um melhor conhecimento dos agentes infectantes, visando um tratamento eficaz. Os testes de susceptibilidade confirmaram a preocupante resistência de *Candida* spp frente a alguns antifúngicos, ressaltando a importância do desenvolvimento de novos fármacos bem como seu uso racional.

A ação antifúngica dos antissépticos bucais e a redução na formação do biofilme demonstrou que eles podem ser uma boa alternativa para a prevenção da candidíase bucal e assim, poderiam ser considerados coadjuvantes importantes na sua prevenção especialmente em grupos de pacientes vulneráveis.

Referências

ALTHAUS, V. A. et al. **Espécies de *Candida* spp. em isolados clínicos e susceptibilidade a antifúngicos de uso hospitalar.** Revista Saúde e Pesquisa, v. 8, n. 1, p. 7-17, 2015.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. **Candidíase.** J Bras Doenças Sex Transm v.22(1), p. 22-38, 2010.

CLSI document **M100-S24**. 7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

DEMITTO, F. O. et al. **Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida spp.* Em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 48, n. 5, pp. 315-321, 2012.

MARTINS NETO, M.; DANESI, C.C.; UNFER, D.T. **Candidíase bucal** – Revisão da Literatura. Revista Brasileira de Ciência da Saúde, v.31, n.1-2, p.16-26, 2005.

MOREIRA, A. C. A. et al. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais.** Salvador, v.8, n.2, p.153-161, 2009.

SCHERMA, A. P. et al. **Avaliação de fatores predisponentes à candidose bucal em recém-nascidos.** Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation**. Journal of Microbiological Methods. v. 40, p.175–79, 2000.