UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Candida spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção

Andresa Piacezzi Nascimento Rodrigues

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Candida spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Andresa Piacezzi Nascimento Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Yoko Ito

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nascimento, Andresa Piacezzi

Candida spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção. Ribeirão Preto, 2009.

98 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ito, Izabel Yoko.

1. *Candida* spp. 2. Biofilme. 3. Escova dental. 4. Clorexidina. 5. Neem.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andresa Piacezzi Nascimento Rodrigues
Candida spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Yoko Ito

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIAS

*A **Deus**,*
Que é o pastor que me conduz pelos caminhos da vida.
Senhor, minhas mãos se elevam e minha voz te louva, pois grandes são as maravilhas que o Senhor realiza em minha vida.
"Assim como a corsa anseia pelas águas vivas,
assim minha alma suspira por vós, ó meu Deus."
(Salmos 41, 2)

Aos meus pais,
***Reinaldo** e **Marlene**,*
Pelo amor, carinho, estímulo, ajuda e compreensão dedicados a mim.
Obrigada pelo exemplo de vida e por todas as vossas virtudes.
"Honra teu pai e tua mãe, para que teus dias se prolonguem
sobre a terra que te dá o Senhor, teu Deus."
(Êxodo 20, 12)

Ao meu esposo,
***Nerilton**,*
Pelo amor, carinho, apoio, compreensão e ajuda.
"Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos,
se eu não tiver amor, sou como o bronze que soa ou
o címbalo que retine."
(I Coríntios 13, 1)

Aos meus irmãos,
***Maira** e **Bruno**,*
Pelo carinho, amor, amizade e apoio.
"Oh, como é bom, como é agradável
para irmãos unidos viverem juntos."
(Salmos 132, 1)

AGRADECIMENTOS

*À **Profa. Dra. Izabel Yoko Ito**,*
Exemplo de sabedoria, humildade, simplicidade, justiça, dedicação, amor, compreensão e bondade. Obrigada por me ensinar essas virtudes. Meu eterno agradecimento, admiração e gratidão.
"Feliz do homem que encontrou a sabedoria,
daquele que adquiriu a inteligência,
porque mais vale esse lucro que o da prata,
e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro."
(Provérbios 3, 13-14)

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no nome do atual Diretor **Prof. Dr. Augusto César C. Spadaro** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos**.*

*À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Regina Célia Candido** e da Vice-Coordenadora **Profa. Dra. Ana Maria de Souza**, pela oportunidade de ser aluna deste Programa e desenvolver este trabalho.*

Aos voluntários, alunos do 2º período do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para a realização desta pesquisa. Sem vocês, nada seria concretizado.

*Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, nos nomes dos funcionários **Maria Teresa Picinoto Maglia** e **José Augusto Maulin**, pelo apoio no processamento das amostras e análise em microscópio eletrônico de varredura.*

*À **Maraisa Palhão Verri**, pelo apoio nos momentos de necessidade e pela amizade.*

*Aos pós-graduandos **Evandro Watanabe** e **Paula Regina de Souza**, pelo apoio, companheirismo e amizade.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão.

"O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza.
O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas;
e dela se serve para acalmar as dores e curá-las;
o farmacêutico faz misturas agradáveis,
compõe unguentos úteis à saúde,
e seu trabalho não terminará,
até que a paz divina se estenda sobre a face da terra."
(Eclesiástico 38, 4.6-8)

“Tu, que habitas sob a proteção do Altíssimo,
que moras à sombra do Onipotente,
dize ao Senhor: Sois meu refúgio e minha cidadela,
meu Deus, em que eu confio.
É ele que te livrará do laço do caçador,
e da peste perniciosa.
Ele te cobrirá com suas plumas;
sob suas asas encontrarás refúgio.
Sua fidelidade te será um escudo de proteção.
Tu não temerás os terrores noturnos,
nem a flecha que voa à luz do dia,
nem a peste que se propaga nas trevas,
nem o mal que grassa ao meio-dia.
Caiam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita:
tu não serás atingido.”

(Salmos 90, 1-7)

RESUMO

NASCIMENTO, A. P. ***Candida* spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção**. 2009. 98f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os objetivos foram avaliar a presença de *Candida* spp. em escovas dentais; a eficácia do Periogard® e do Neem Sattiva®, em spray, na desinfecção destas escovas; a atividade antimicrobiana, *in vitro*, do Neem Sattiva®, do Periogard® e da solução de gluconato de clorexidina a 0,5% por meio da Diluição Inibitória Máxima (DIMax); e a capacidade de *Candida* spp. formar biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais (empregando a técnica de cultura microbiana e a microscopia eletrônica de varredura). Participaram do estudo clínico randomizado 61 estudantes de Odontologia da FORP – USP. O estudo foi realizado em três etapas. Em cada etapa, os voluntários receberam escovas novas e realizaram a escovação dentária sem dentifrício, por dois minutos. Cada solução foi borrifada sobre as cerdas das escovas por seis vezes. Após quatro horas à temperatura ambiente, as escovas foram submetidas ao processamento microbiológico para o isolamento e identificação das espécies de *Candida*. A DIMax dos antissépticos foi realizada utilizando o método da diluição em ágar. As escovas dentais de 37,3% dos indivíduos estavam contaminadas por *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Candida* sp.). O Periogard® e o Neem Sattiva®, em spray, inibiram o crescimento de *Candida* spp. em 40,9 e 9,1% das escovas, respectivamente. Portanto, o spray de Periogard® foi mais eficaz que o spray de Neem Sattiva® para esse propósito. As DIMaxs do Neem Sattiva®, do Periogard® e da solução de clorexidina a 0,5% frente a 63 cepas de *Candida* spp. foram 1/10, 1/20 e 1/40, respectivamente. *Candida* spp. foram capazes de formar biofilme, *in vitro*, sobre hastilhas (polietileno de baixa densidade) de escovas dentais. O mesmo não ocorreu nas cerdas de náilon.

Palavras-chave: *Candida* spp. Biofilme. Escova dental. Clorexidina. Neem.

ABSTRACT

NASCIMENTO, A. P. ***Candida* spp. on toothbrushes and efficacy of antimicrobial agents for their disinfection**. 2009. 98f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The purposes were to evaluate the presence of *Candida* spp. on toothbrushes; the efficacy of Periogard® and Neem Sattiva®, in spray, in the disinfection of these toothbrushes; the *in vitro* antimicrobial activity of Neem Sattiva®, Periogard® and solution containing 0.5% chlorhexidine gluconate by the Maximum Inhibitory Dilution (MID); and the ability of *Candida* spp. to form biofilm *in vitro* on the bristles and small sticks of toothbrushes (using the microbial culture technique and scanning electron microscopy). In the randomized clinical study participated 61 students matriculated at the Dentistry course of the FORP – USP. The study was performed into three phases. In each phase, volunteers received new toothbrushes and performed toothbrushing with no dentifrice, during two minutes. Each solution was sprayed six times on the toothbrush bristles. After four hours at room temperature, toothbrushes were submitted to microbiological processing for the isolation and identification of *Candida* species. MID of antiseptics was performed using the agar dilution method. Toothbrushes used by 37.3% of subjects were contaminated by *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. parapsilosis* and *Candida* sp.). Periogard® and Neem Sattiva®, in spray, inhibited growth of *Candida* spp. in 40.9 and 9.1% of toothbrushes, respectively. Therefore, Periogard® spray was more efficacious than Neem Sattiva® spray for this purpose. MID of Neem Sattiva®, Periogard® and solution containing 0.5% chlorhexidine against 63 *Candida* spp. strains were 1/10, 1/20 and 1/40, respectively. *Candida* spp. were able to form biofilm *in vitro* on the toothbrush small sticks (low-density polyethylene). This did not occur on the nylon bristles.

Keywords: *Candida* spp. Biofilm. Toothbrush. Chlorhexidine. Neem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da metodologia empregada no estudo clínico randomizado..... 33

Figura 2. Fluxograma da metodologia empregada no teste da Diluição Inibitória Máxima..... 36

Figura 3. Fluxograma da metodologia empregada no processamento para microscopia eletrônica de varredura..... 39

Figura 4. Eletromicrografia evidenciando ausência de biofilme de *C. parapsilosis* sobre as cerdas de náilon da escova dental Sorriso® Kolynos Original, em aumento de 75x..... 47

Figura 5. Eletromicrografia evidenciando ausência de microrganismos sobre as hastilhas da escova do controle negativo, em aumento de 75x..... 47

Figura 6. A – F: Eletromicrografias evidenciando biofilmes de *C. albicans* sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®, em aumentos de 2000 e 3500x..... 48

Figura 7. A – F: Eletromicrografias evidenciando biofilmes de *C. parapsilosis* sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®, em aumentos de 2000 e 3500x..... 49

Figura 8. A – F: Eletromicrografias evidenciando biofilmes da *Candida* sp. sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®, em aumentos de 1000 a 3500x..... 50

Figura 9. Comparação entre as soluções, em relação à presença ou ausência de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais (teste dos sinais)..... 51

Figura 10. Média dos escores das diluições dos três antissépticos avaliados... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e procedência dos antissépticos bucais avaliados..... 24

Tabela 2 – Randomização dos 61 indivíduos em três grupos, nas três etapas do estudo..... 25

Tabela 3 – Presença de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais utilizadas por 59 indivíduos nos grupos controle e experimentais..... 43

Tabela 4 – *Candida* spp. isoladas das cerdas das escovas dentais utilizadas por 27 indivíduos nos grupos controle e experimentais..... 44

Tabela 5 – Cepas de *Candida* spp. inibidas (de um total de 63 cepas) em cada diluição dos antissépticos avaliados..... 46

Tabela 6 – Comparação entre água destilada esterilizada e Periogard®, de acordo com o teste dos sinais..... 93

Tabela 7 – Comparação entre água destilada esterilizada e Neem Sattiva®, de acordo com o teste dos sinais..... 93

Tabela 8 – Comparação entre Periogard® e Neem Sattiva®, de acordo com o teste dos sinais..... 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	*Brain Heart Infusion*
ml	Mililitro
PBS	*Phosphate buffered saline*
UFC	Unidades formadoras de colônia
TYCSB	Ágar *Trypticase*, *Yeast*, *Cystine*, *Sucrose*, *Bacitracin*
LBS	Ágar Lactobacilos
cm	Centímetro
µl	Microlitro
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
CaSaB	Caldo sacarose bacitracina
SB_{20}	Ágar sacarose bacitracina
Ni	Ágar salgado gema de ovo
Ask	Ágar sangue suplementado com menadiona
EAM	Ágar eosina azul de metileno
TSA	*Tryptic Soy Agar*
mm	Milímetro
CBD	*Calgary biofilm device*
DIMax	Diluição Inibitória Máxima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
LTDA	Limitada
BHT	*Butylated hydroxytoluene*
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
g	Grama
mg	Miligrama
ATCC	*American Type Culture Collection*
rpm	Rotações por minuto
M	Molar
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
kV	Quilovolt
CHX	Clorexidina
HIV	*Human Immunodeficiency Virus*
AIDS	*Acquired Immunodeficiency Syndrome*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
kg	Quilograma
MTCC	*Microbial Type Culture Collection*
NTCC	*National Type Culture Collection*
CFM	Concentração Fungicida Mínima
µg	Micrograma
PVC	Cloreto de polivinil

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas iv
Lista de abreviaturas e siglas v

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISTA DA LITERATURA..... 6
2.1 Contaminação de escovas dentais por *Candida* spp..... 7
2.2 Desinfecção de escovas dentais..... 10
2.3 Biofilmes formados por *Candida* spp..... 17

3. OBJETIVOS..... 20

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS..... 22
4.1 Estudo clínico randomizado..... 23
4.1.1 Seleção da amostra..... 23
4.1.2 Soluções avaliadas..... 23
4.1.3 Formação dos grupos experimentais..... 24
4.1.4 Escovação dentária e aplicação dos antissépticos bucais..... 25
4.1.5 Meios de cultura utilizados..... 26
4.1.6 Processamento microbiológico..... 30
4.2 Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos..... 34
4.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais..... 37
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura..... 38
4.4 Análise estatística..... 40

5. RESULTADOS..... 41
5.1 Estudo clínico randomizado..... 42
5.1.1 Presença de *Candida* spp. nas escovas dentais..... 42

5.1.2 Desinfecção das escovas dentais com Periogard® e Neem Sattiva®... 44
5.2 DIMax dos antissépticos..... 45
5.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais..... 46
5.4 Análise estatística..... 51

6. DISCUSSÃO..... 54
6.1 Metodologia..... 55
6.1.1 Estudo clínico randomizado..... 55
6.1.2 DIMax dos antissépticos..... 59
6.1.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais..... 60
6.2 Resultados..... 61
6.2.1 Estudo clínico randomizado..... 61
6.2.1.1 Presença de *Candida* spp. nas escovas dentais..... 61
6.2.1.2 Desinfecção das escovas dentais com Periogard®..... 64
6.2.1.3 Desinfecção das escovas dentais com Neem Sattiva®..... 65
6.2.2 DIMax dos antissépticos..... 68
6.2.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais..... 69

7. CONCLUSÕES..... 72

8. REFERÊNCIAS..... 74

APÊNDICES..... 89

ANEXOS..... 96

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é normalmente colonizada por um número significativo de espécies de microrganismos (SOCRANSKY; MANGANIELLO, 1971). O gênero *Candida* compreende a maioria das leveduras isoladas da cavidade bucal (COSTA et al., 2005; MARSH; MARTIN, 2005), sendo a *Candida albicans* a espécie mais comum (COSTA et al., 2009; WEBB et al., 1998). Entretanto, outras espécies foram isoladas, incluindo *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* (BLIGNAUT, 2007), *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guillermondii*, *C. zeylanoides*, *C. rugosa* e *C. geocandidium* (KLEINEGGER et al., 1996). A *C. albicans* e outras espécies de *Candida* são microrganismos oportunistas que vivem na cavidade bucal de indivíduos saudáveis como comensais, mas podem se tornar patogênicos devido à quebra na homeostase (KLEINEGGER et al., 1996). Essas leveduras são os agentes etiológicos da candidose bucal (MARSH; MARTIN, 2005), o que torna relevante o controle desses microrganismos para a manutenção da saúde bucal.

Costerton, Stewart e Greenberg (1999) definiram biofilme como uma comunidade estruturada de microrganismos embutidos em uma matriz de polímeros e aderentes a uma superfície viva ou inanimada. Uma característica importante dos microrganismos do biofilme é a resistência aumentada aos agentes antimicrobianos (BAILLIE; DOUGLAS, 2000). A *C. albicans* é capaz de formar biofilme em quase todos os dispositivos médicos (NETT; ANDES, 2006), incluindo cateteres urinários e vasculares, próteses e outros (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Além desses, também podem ser citados alguns dispositivos removíveis diariamente, como lentes de contato e próteses totais (NETT; ANDES, 2006).

A maioria das espécies de *Candida* é capaz de formar biofilme *in vitro* (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Entretanto, a formação e a estrutura desses biofilmes são influenciadas por vários fatores, como a natureza da superfície de contato, os fatores ambientais, a morfogênese da *Candida* e as espécies de *Candida* envolvidas (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

Alguns pesquisadores avaliaram a contaminação de escovas dentais por leveduras do gênero *Candida* (MARCANO, 1981; MOTZFELD et al., 1999). Marcano (1981) demonstrou que *C. albicans* estava presente na boca de 28% dos pacientes hospitalizados e em 18% das escovas dentais desses indivíduos.

Escovas dentais contaminadas podem servir como reservatório para a inoculação/reinoculação de microrganismos (CARVAJAL et al., 1995; SVANBERG, 1978). As escovas dentais também podem servir como um vetor de transmissão de microrganismos de um indivíduo para o outro (CARVAJAL et al., 1995). Isso é muito relevante em um país como o Brasil, onde pode ocorrer o uso coletivo/comunitário de escovas dentais, principalmente em famílias de baixo nível sócio-econômico (BORGES et al., 1996; GRIGOLETTO et al., 2001).

Um estudo realizado em cães saudáveis (GLASS; MARTIN; PETERS, 1989) demonstrou que a escovação dental com escovas esterilizadas produziu ulceração na gengiva ou mucosa. Quando os cães estavam imunocomprometidos, ocorreu um aumento na incidência de ulceração após a escovação. Entretanto, a incidência maior de ulceração ocorreu nos cães saudáveis após o uso de escovas auto contaminadas, ou seja, as escovas utilizadas periodicamente nos respectivos cães. Além disso, alguns cães apresentaram bacteriemia após a escovação.

A bacteriemia associada à escova dental também foi reportada em um caso (KENNEDY et al., 2003), no qual uma criança neutropênica com leucemia mielóide aguda apresentou bacteriemia por *Streptococcus oralis*. As análises fenotípicas e genotípicas demonstraram que o microrganismo isolado da escova dental do paciente era o mesmo microrganismo isolado da hemocultura e da boca do paciente. Esses achados reforçam a importância de desinfetar as escovas dentais e trocá-las periodicamente.

Somente nas últimas duas décadas foram relatados estudos direcionados à contaminação microbiana de escovas dentais *in vivo* e, propondo métodos para sua desinfecção (BARBOSA, 2003; BARBOZA, 2004; CAUDRY; KLITORINOS; CHAN, 1995; CESCO et al., 1995; GLASS; FURGASON; MOODY, 1997; MACARI, 2002; NASCIMENTO et al., 2008; NELSON-FILHO et al. 2000, 2006; SANCHES et al., 2001; SATO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2002).

Alguns pesquisadores avaliaram o efeito de agentes antimicrobianos, sob a forma de spray, na desinfecção de escovas dentais. Nascimento et al. (2008) avaliaram o efeito do Periogard® e do Plax® na formação do biofilme de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais utilizadas uma única vez por estudantes universitários. Após a escovação, as escovas foram lavadas, secas e cada antisséptico bucal borrifado seis vezes sobre as cerdas. O Periogard® foi o antisséptico mais eficaz na inibição da formação do biofilme.

Em 2006, Nelson-Filho et al. avaliaram a contaminação de escovas de crianças (24 a 48 meses de idade) por estreptococos do grupo mutans e a eficácia do Periogard®, do Brushtox® e de uma solução experimental para a desinfecção destas escovas. Após a escovação, as escovas foram enxaguadas e os agentes antimicrobianos borrifados quatro vezes sobre as cerdas. O Periogard® e a solução experimental foram os antissépticos mais eficazes.

No comércio, há uma variedade de antissépticos bucais. Esses produtos para higiene bucal podem apresentar em sua composição substâncias sintéticas, naturais, ou ambas, com atividade antimicrobiana (JACOBSEN; EPSTEIN; COHAN, 2001).

O Periogard® é um antisséptico bucal à base de clorexidina, uma bisbiguanida catiônica de amplo espectro antimicrobiano que tem sido considerada o agente antimicrobiano mais eficaz contra o biofilme placa dentária e contra a gengivite (ADAMS; ADDY, 1994). A clorexidina apresenta baixa toxicidade para células de mamíferos e uma alta afinidade às mucosas e à pele (HERRERA et al., 2003). A maior vantagem da clorexidina consiste na sua substantividade, pois esta se liga a tecidos moles e mineralizados da boca, agindo por um longo tempo após o seu uso (ADAMS; ADDY, 1994).

Os efeitos da clorexidina em leveduras são similares aos efeitos em bactérias (HIOM; FURR; RUSSELL, 1995). Nas leveduras, a clorexidina interage com a parede celular, membrana citoplasmática e citoplasma (HIOM et al., 1993). A membrana citoplasmática sofre mudanças na sua integridade, o que resulta na perda de constituintes celulares (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Em altas concentrações, a clorexidina causa a coagulação de constituintes intracelulares (BOBICHON; BOUCHET, 1987; MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O Neem Sattiva® é um antisséptico bucal à base de neem, própolis, alcaçuz, óleo de eucalipto e óleo de menta. A *Azadirachta indica*, conhecida como neem, é uma árvore nativa na Índia e no sudeste da Ásia (BRAHMACHARI, 2004), onde é utilizada há milhares de anos para a manutenção da saúde gengival e dentária (PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004). Devido à sua versatilidade, todas as partes da árvore (folhas, flores, raízes, sementes e casca) são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de vários tipos de doenças (SUBAPRIYA; NAGINI, 2005), como a malária (OMAR et al., 2003), escabiose, diabetes (BRAHMACHARI, 2004), úlceras estomacais, câncer, gengivite e periodontite (SUBAPRIYA; NAGINI, 2005). Além das

suas propriedades medicinais, o neem apresenta propriedades inseticidas, pesticidas e agroquímicas (BRAHMACHARI, 2004).

A atividade antibacteriana do neem foi demonstrada contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância médica (SAIRAM et al., 2000; SIDDIQUI et al., 1992). Também foi demonstrada a sua atividade antifúngica (MOSSINI; OLIVEIRA; KEMMELMEIER, 2004; SAIRAM et al., 2000) e antiviral (PARIDA et al., 2002; SAIRAM et al., 2000).

Atualmente, várias formulações à base de neem estão disponíveis no comércio, como sabonetes (BRAHMACHARI, 2004), xaropes, dentifrícios e antissépticos bucais.

2. REVISTA DA LITERATURA

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1 Contaminação de escovas dentais por *Candida* spp.

O primeiro pesquisador a relatar sobre a contaminação microbiana de escovas dentais foi Cobb (1920). Observou que um paciente de 26 anos de idade era acometido por infecções recorrentes na cavidade bucal e sintomas reumáticos, os quais foram minimizados pela imersão da escova dental em álcool antes e após a utilização. Deste modo, acreditando ser a escova a causa de infecções recorrentes na cavidade bucal, recomendou a desinfecção da mesma com soluções antissépticas, sendo o álcool a solução mais segura. Comentou, ainda, sobre a necessidade de se desenvolver uma escova dental constituída por um pedaço de algodão ou feltro, que pudesse ser descartada após a utilização.

Em 1981, Marcano avaliou a presença de *C. albicans* na boca e nas escovas dentais de 229 pacientes hospitalizados em diferentes Serviços do Hospital Universitário de Caracas, Venezuela. De cada paciente, foram obtidas duas amostras da mucosa da boca: uma amostra foi semeada em um tubo contendo ágar bile e a outra em um tubo contendo leite diluído. Metade das escovas dos pacientes foi semeada em ágar bile e a outra metade em leite diluído. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (23 a 28°C) e examinadas após três e cinco dias quanto à presença de clamidoconídios. Isolou *C. albicans* da boca de 28% dos pacientes e das escovas dentais de 18% dos pacientes.

Glass e Lare (1986) coletaram escovas dentais de 10 pacientes saudáveis e 10 pacientes com doença bucal (lesões cariosas, doença periodontal ou alguma doença da mucosa). As cabeças das escovas foram cortadas, introduzidas em tubos contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37°C até que ocorresse a turvação do meio de cultura. Após o período de incubação, semearam em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: ágar Sabouraud dextrose com extrato de levedura, ágar sangue, ágar chocolate, ágar sangue reduzido, ágar sangue com ácido nalidíxico e coliston reduzido e ágar sangue reduzido com kanamicina e vancomicina. Após o período de incubação, as colônias predominantes foram analisadas e identificadas. Também foram analisadas 10 escovas dentais novas provenientes de dois fabricantes. Das cinco escovas de um fabricante, quatro estavam contaminadas com *Staphylococcus epidermidis.* As escovas do outro

fabricante estavam isentas de microrganismos. Os seguintes microrganismos foram isolados das escovas dos pacientes com doença bucal: *S. epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium clostridiforme*, *Serratia* sp., *Propionibacterium* sp., *Bacteroides* sp. e estreptococos α hemolíticos. Das escovas de pacientes saudáveis isolaram: *C. albicans*, *Bacteroides melaninogenicus*, *B. oralis*, estreptococos α hemolíticos, *Raoultella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*), *Clostridium ramosum*, *S. epidermidis*, *E. cloacae* e *Bacteroides* sp. Houve correlação entre escovas contaminadas e doença bucal. O tempo de uso das escovas variava de dois dias a 24 meses. Não houve correlação entre o tempo de uso da escova e a presença de microrganismos. Concluíram que as escovas dentais podem ser contaminadas, podendo exercer um papel no desenvolvimento de doenças sistêmicas ou localizadas. Recomendaram a troca das escovas dentais, no mínimo, uma vez por mês ou após alguma enfermidade.

Em um estudo piloto, Taji e Rogers (1998) avaliaram a contaminação microbiana de escovas dentais. Dez indivíduos adultos receberam uma escova dental nova e um dentifrício fluoretado, os quais foram utilizados por três semanas. Após esse período, as escovas foram coletadas, seccionadas e a porção da cabeça transferida para tubos contendo 10ml de PBS (*phosphate buffered saline*) esterilizado. Os tubos foram agitados em mixer por um minuto, seguido por ultrassom por mais 30 segundos e em mixer, novamente, por 15 segundos. A suspensão foi submetida à diluição decimal seriada em PBS e semeada em vários meios de cultura seletivos. Após a incubação, as colônias foram contadas, sendo as mais representativas submetidas à coloração de Gram e identificação. Para identificar fatores que poderiam influenciar na contagem dos microrganismos, foram obtidas informações quanto ao método utilizado para a lavagem das escovas, forma e local de armazenagem pós-lavagem, frequência de escovação e pré-lavagem da boca. Outros parâmetros avaliados foram: lesões de cárie abertas, evidência de doença periodontal e anormalidades da mucosa. O número total de microrganismos isolados de cada escova variou de 10^4 a 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC). Estafilococos foram isolados de todas as escovas, sendo o gênero mais dominante quantitativamente. Estreptococos foram isolados de todas as escovas, exceto uma. *Candida*, corinebactérias, pseudomonas e coliformes foram isolados de 70, 60, 50 e 30% das escovas, respectivamente. Entretanto, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e bacilos Gram-negativos anaeróbios pigmentados de negro não foram

detectados em nenhuma das escovas. Não houve relação entre os fatores avaliados e os microrganismos isolados das escovas dentais. Entretanto, sugeriram a necessidade de estudos complementares que possam avaliar parâmetros adicionais como o uso de antissépticos bucais antes da escovação.

Motzfeld et al. (1999) avaliaram a contaminação de escovas dentais de 40 estudantes do primeiro ano da Escola de Odontologia da Universidade do Chile. Recolheram as escovas dentais dos alunos, as introduziram em tubos contendo o meio *Thioglycollate* e as incubaram por 24 horas. Após esse período, semearam o caldo nos seguintes meios de cultura: ágar *Trypticase*, *Yeast*, *Cystine*, *Sucrose*, *Bacitracin* (TYCSB; para *Streptococcus mutans*; incubação: 48 horas em jarra Gas-Pack), ágar Sabouraud com cloranfenicol (para *Candida* spp.; incubação: 48 horas em aerobiose), ágar LBS (para lactobacilos; incubação: 48 horas em jarra com vela), ágar sangue com hemina e menadiona (para os microrganismos anaeróbios e facultativos; incubação: 96 horas em jarra Gas-Pack). *S. mutans* e *Candida* spp. foram isolados de apenas 2,8% das amostras. Lactobacilos foram isolados de apenas 1,2% das amostras. Entretanto, microrganismos anaeróbios foram isolados de 100% das amostras.

Bunetel et al. (2000) avaliaram a retenção e sobrevivência *in vitro* de três espécies de microrganismos (*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 26555) em três tipos de escovas dentais (escovas elétricas Broxobrush e Braun, e escova manual Jordan), esterilizadas em óxido de etileno. Duas séries de experimentos foram realizadas para cada escova e cada microrganismo. A primeira (série 1) para retenção dos microrganismos na cabeça da escova e a segunda (série 2) na cabeça e na parte do cabo que entra na boca durante a escovação de rotina (introdução de 4cm). Durante a fase inicial as escovas retiveram 1,0 a 2,0% do inóculo de *P. gingivalis*, mas somente 0,2 a 0,3% do de *S. mutans*. A retenção de *C. albicans* variou de 0,3 a 1,8%. O número de microrganismos detectados aumentou conforme a área exposta. Depois de 24 horas, *P. gingivalis* e *S. mutans* foram detectados em apenas um tipo de escova (Braun). *C. albicans* sobreviveu nos três tipos de escova. Concluíram que as escovas dentais podem ser colonizadas rapidamente e servir como veículo de disseminação. Assim, sugeriram que as escovas devem ser sacudidas e mantidas em um ambiente arejado para reduzir o nível de contaminação.

Em 2005, Wetzel et al. avaliaram a contaminação de escovas dentais utilizadas uma única vez por 45 crianças (seis a 13 anos). Três tipos de escovas foram avaliados de acordo com o tipo de construção: escova com tufos grampeados (escova A); escova com tufos fixados nas cavidades (escova B); escova de cerdas fixadas individualmente nas cavidades (escova C). Após três minutos de escovação com dentifrício, as escovas foram avaliadas: imediatamente após o uso ou após duas ou oito horas de secagem ao ar livre. As escovas foram colocadas em 15,0ml de solução de Sputasol e sonicadas. Posteriormente, 1,0ml da suspensão microbiana foi centrifugado e 800,0µl do sobrenadante foram descartados. O sedimento foi ressuspendido e 20,0µl foram semeados em ágar Sabouraud. A identificação foi realizada utilizando apenas o teste de formação de tubo germinativo. *C. albicans* foi a única espécie de *Candida* isolada. Imediatamente após a escovação, a contaminação maior ocorreu na escova B (média: 1070UFC/ml). Após duas horas de secagem ao ar livre, as escovas A e B apresentaram, em média, 1630 e 1700UFC/ml, respectivamente. Entretanto, a escova C apresentou apenas 7UFC/ml em média. Após oito horas de secagem ao ar livre, não havia *C. albicans* nas escovas A e C. Entretanto, na escova B ainda havia, em média, 6UFC/ml. Os resultados demonstraram que escovas cujas cerdas são fixadas individualmente (escova C), retiveram um número menor de microrganismos.

2.2 Desinfecção de escovas dentais

Em 1981, Feo avaliou a sobrevivência de *C. albicans*, *in vitro*, em três tipos de escovas dentais: duas de cerdas de náilon de diferentes marcas (PRO^R *double duty* e CARAVELLLE^R) e uma de cerda natural (PRO^R). A desinfecção destas escovas também foi avaliada. No primeiro experimento, quatro escovas de cada marca foram colocadas em uma suspensão (4.10^9UFC/ml) de *C. albicans* por um minuto. Metade das escovas foi guardada em sua caixa original; a outra metade foi mantida ao ar livre. Após uma e duas semanas, as escovas foram semeadas em ágar bile ou em leite diluído. O microrganismo sobreviveu em todas as escovas guardadas em sua caixa original por duas semanas e em todas as escovas deixadas ao ar livre por uma semana (exceto na escova de cerdas naturais deixada ao ar livre, na qual o microrganismo sobreviveu por duas semanas). No segundo experimento, três

escovas de cada marca foram colocadas em uma suspensão (4.10^6UFC/ml) de *C. albicans* por um minuto e mantidas ao ar livre por 24, 48 e 72 horas. O microrganismo sobreviveu em todas as escovas por até 72 horas. Para o experimento de desinfecção, nove escovas de cada marca foram colocadas em uma suspensão (4.10^6UFC/ml) de *C. albicans* e armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas. Três grupos de três escovas foram imersos em uma solução de ácido bórico a 4,0% momentaneamente ou por cinco ou 10 minutos. O mesmo procedimento de desinfecção citado acima foi realizado novamente utilizando uma solução de ácido salicílico a 2/1000 como desinfetante. O método da imersão momentânea em solução de ácido bórico a 4,0% ou de ácido salicílico a 2/1000 foi o mais eficaz. Portanto, sugeriu esse método de desinfecção para prevenir a sobrevivência de *C. albicans* em escovas dentais, especialmente quando o paciente apresenta candidose bucal crônica. Sugeriu também o uso de escovas de cerdas de náilon.

Em um estudo *in vitro*, Meier et al. (1996) avaliaram a eficácia de um antisséptico contendo cloreto de cetilpiridínio (CCP), sob a forma de spray, na desinfecção de escovas dentais. Prepararam um inóculo de *S. epidermidis* e *C. albicans* contendo, aproximadamente, 1.10^8UFC/ml. No primeiro experimento utilizaram 52 escovas, das quais 12 foram utilizadas como controle positivo e negativo. As escovas foram contaminadas pela imersão em 10,0ml dos caldos contendo os microrganismos, seguida de agitação por 15 segundos. Vinte escovas foram contaminadas com *S. epidermidis*, das quais 10 foram desinfetadas com três borrifos de CCP imediatamente após a contaminação e 10 não desinfetadas. Vinte escovas foram contaminadas com *C. albicans* e submetidas ao mesmo procedimento. As 40 escovas foram mantidas ao ar livre por 12 horas para a secagem das cerdas. Após esse período, cada escova foi agitada em 10,0ml de salina esterilizada por 15 segundos. Essa suspensão foi submetida à diluição decimal seriada e semeada em ágar sangue de carneiro a 5,0% ou ágar Sabouraud dextrose. No segundo experimento, o procedimento realizado foi similar ao do primeiro experimento. A diferença foi que todas as escovas foram mantidas em recipientes fechados durante o período de secagem das cerdas. O CCP, sob a forma de spray, causou uma redução significante no número de microrganismos presentes nas escovas dentais, quando comparado com o grupo controle. O uso do spray de CCP em escovas secas ao ar livre reduziu o número de *S. epidermidis* em

100 vezes, enquanto que o número de *C. albicans* foi reduzido em 94,0%. Escovas armazenadas em recipientes fechados apresentaram um número significantemente maior de microrganismos do que as armazenadas ao ar livre. Concluíram que o CCP parece ser eficaz na desinfecção de escovas dentais frente aos microrganismos avaliados, sendo este um método prático e econômico para a prevenção de contaminação cruzada.

Nelson-Filho et al. (2000) avaliaram o nível de contaminação de escovas dentais de 19 crianças (cinco a 12 anos de idade) por estreptococos do grupo mutans e um método para a desinfecção das mesmas. As crianças receberam uma escova dental nova que foi utilizada por cinco dias (uma vez por dia). Após esse período, as escovas foram recolhidas e divididas em três grupos. No grupo I, as escovas foram imersas em uma solução contendo 0,12% de gluconato de clorexidina (Farmácia de Manipulação Doce Erva - Ribeirão Preto - SP); no grupo II, em 1,0% de hipoclorito de sódio e no grupo III, em água de torneira esterilizada (grupo controle) por 20 horas. Em seguida, as escovas foram colocadas em tubos contendo 10,0ml de caldo sacarose bacitracina (CaSaB). Após a incubação a 37°C por três a quatro dias, as cerdas foram analisadas em estereomicroscópio sob luz refletida. As colônias desenvolvidas sobre as cerdas foram removidas e semeadas em ágar sacarose bacitracina (SB_{20}) para confirmação. As cerdas de algumas escovas foram removidas e processadas para a microscopia eletrônica de varredura. Não houve desenvolvimento bacteriano nas escovas dos grupos I e II. Entretanto, as escovas do grupo III apresentaram desenvolvimento de estreptococos do grupo mutans, cujo número de colônias variou de 21 a 120. Concluíram que houve formação de biofilme de estreptococos do grupo mutans sobre as cerdas das escovas do grupo III. As soluções contendo 0,12% de gluconato de clorexidina e 1,0% de hipoclorito de sódio foram eficazes na desinfecção das escovas dentais.

Em 2002, Sato avaliou a eficácia de diferentes soluções antimicrobianas, sob a forma de spray, na desinfecção de escovas dentais utilizadas por 30 adultos de 23 a 56 anos de idade, membros de corporação pública. Cada indivíduo testou quatro formulações, uma por semana, borrifando nas cerdas da escova dental uma das seguintes soluções: formulação básica e digluconato de clorexidina a 0,12%; formulação básica e CCP; formulação básica somente; água de torneira esterilizada (grupo controle). Ao final de cada semana, era realizada a análise microbiológica

das escovas para a contagem das UFC/ml e análise do biofilme de estreptococos do grupo mutans sobre as cerdas. Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar SB_{20} para a detecção de estreptococos do grupo mutans, ágar salgado gema de ovo (Ni) para estafilococos; ágar sangue suplementado com menadiona (Ask) para anaeróbios estritos; ágar sangue para aeróbios totais e ágar eosina azul de metileno (EAM) para o isolamento de bacilos Gram-negativos. Mostrou que as escovas do grupo controle estavam contaminadas por diferentes microrganismos, como: anaeróbios estritos, aeróbios, bacilos Gram-negativos, estreptococos, *S. mutans* e estafilococos. As formulações contendo clorexidina e CCP reduziram significantemente a contaminação microbiana das escovas. Concluiu que a aplicação de sprays contendo clorexidina e CCP na formulação básica parece ser um método prático, eficaz e econômico para a desinfecção de escovas dentais de adultos.

Barbosa (2003) avaliou a contaminação de escovas dentais de 39 indivíduos portadores de necessidades especiais, por estreptococos do grupo mutans. Também avaliou a eficácia do Periogard® e do Reach® (0,05% de CCP) para a desinfecção destas escovas. Os procedimentos clínicos foram divididos em três etapas. Na primeira etapa, os pacientes efetuaram a escovação utilizando dentifrício Sorriso®, enxaguaram as escovas com água e, a seguir, elas foram borrifadas com spray de água de torneira esterilizada. Na segunda e terceira etapas, a escovação foi realizada utilizando o mesmo dentifrício e as escovas borrifadas com Periogard® e Reach®, respectivamente. Então, as escovas foram submetidas à cultura microbiana, empregando o meio de cultura CaSaB. Na etapa I (grupo controle), os estreptococos do grupo mutans estavam presentes em 76,9% das cerdas das escovas, com número de colônias/biofilmes variando de dois a mais de 100. Na etapa II (Periogard®) não observou colonização por estreptococos do grupo mutans. Na etapa III (Reach®), 10,2% das escovas estavam colonizadas pelo microrganismo, com número de colônias/biofilmes variando de um a 31. Concluiu que as escovas dentais de pacientes portadores de necessidades especiais tornaram-se contaminadas por estreptococos do grupo mutans, após um minuto de escovação. O Periogard® e o Reach®, sob a forma de spray, podem ser indicados para reduzir a contaminação das escovas dentais por esses microrganismos. Entretanto, com a finalidade de tornar as escovas isentas de microrganismos, o

Periogard® apresentou eficácia estatisticamente superior às demais soluções avaliadas.

Em um estudo *in vitro*, Neal e Rippin (2003) avaliaram a eficácia do Brushtox®, um desinfetante, sob a forma de spray, desenvolvido na Inglaterra para a desinfecção de escovas dentais. O Brushtox® foi testado frente a três espécies de bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*) e duas espécies de fungos (*C. albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*), utilizando quatro diferentes testes: teste de difusão em ágar, com *Tryptic Soy Agar* (TSA) e ágar Sabouraud dextrose; teste Europeu de suspensão; teste AOAC para produtos germicidas em spray (para avaliar a eficácia do Brushtox® como um spray desinfetante); e o teste de desinfecção, *in vitro*, de escovas dentais, no qual as cabeças de seis escovas foram colocadas em placas de Petri e inoculadas com 0,1ml de uma mistura da suspensão das três bactérias (cada uma na concentração de 1 a 5.10^6UFC/0,1ml) juntamente com 0,5% de soroalbumina bovina para simular condições de sujidade. As cabeças de três escovas foram borrifadas nove vezes com o Brushtox® e incubadas a 20ºC por duas horas. As cabeças das três escovas restantes foram utilizadas como controle não tratado. Todas as cabeças das escovas foram colocadas, individualmente, em garrafas de vidro esterilizadas contendo pérolas de vidro e caldo tripticase soja com um agente neutralizante. Após a agitação vigorosa por um minuto, as amostras foram submetidas à diluição decimal seriada, semeadas em TSA e incubadas a 37ºC por 18 a 24 horas. No teste de difusão em ágar, o Brushtox® apresentou uma ação inibitória significante contra os microrganismos testados. Em relação aos outros três testes, o Brushtox® apresentou quase 100% de eficácia. Frente às evidências, concluíram que o Brushtox® é eficaz contra bactérias e fungos presentes em escovas dentais, portanto, um método eficaz na promoção da saúde bucal de indivíduos debilitados ou saudáveis.

Barboza (2004) avaliou a contaminação microbiana de escovas dentais utilizadas por 57 crianças de sete a 10 anos de idade. Também foi avaliada a eficácia do spray de Periogard® na desinfecção destas escovas. O estudo foi realizado em duas etapas. Na etapa I, as crianças realizaram uma única escovação de quatro minutos, utilizando dentifrício fluoretado (Tandy), enxaguaram as escovas em água corrente e, em seguida, as mesmas foram borrifadas (cinco vezes) com spray de água de torneira esterilizada. Na etapa II, o procedimento descrito

anteriormente foi repetido; entretanto, as escovas foram borrifadas com Periogard®. Após quatro horas à temperatura ambiente, as escovas foram colocadas em tubos de 25X150mm contendo 10,0ml de Caldo *Letheen* e agitadas por dois minutos. A suspensão foi diluída em PBS e semeada em: ágar sangue, ágar SB_{20}, ágar Mitis Salivarius, ágar Ni, CHROMagar™ *Candida* e ágar MacConkey. Após o período de incubação, realizou a contagem do número de UFC/ml. Além disso, as escovas foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio CaSaB. Após a incubação a 37ºC por três a quatro dias, as escovas foram analisadas quanto à formação de biofilme de estreptococos do grupo mutans, sendo efetuada a contagem das colônias/biofilmes aderidos às cerdas. Duas escovas de cada grupo foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura. Aeróbios facultativos, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans, *S. aureus*, bacilos Gram-negativos e leveduras foram isolados das escovas do grupo controle. Em relação à formação do biofilme de estreptococos do grupo mutans, 80,7% das escovas apresentaram-se positivas. Quando comparadas com o grupo controle, as escovas do grupo II apresentaram diferença estatisticamente significante no número de UFC dos microrganismos avaliados. Concluiu que as escovas dentais tornaram-se contaminadas por microrganismos e que o Periogard®, sob a forma de spray, foi eficaz em reluzi-los ou eliminá-los.

Em um estudo clínico randomizado, Nelson-Filho et al. (2006) avaliaram a contaminação de escovas dentais de 52 crianças (24 a 48 meses de idade) por estreptococos do grupo mutans e a eficácia de alguns antissépticos (Periogard®, Brushtox® e uma solução experimental, à base de Cosmocil CQ[â] e Myacide pharma BP[â]), em spray, para a desinfecção destas escovas. Como grupo controle foi utilizada a água de torneira esterilizada. Em cada uma das quatro etapas do estudo, as crianças foram submetidas à escovação dental sem dentifrício, por um minuto. As escovas foram enxaguadas e cada solução borrifada quatro vezes sobre as cerdas. Após um período de quatro horas à temperatura ambiente, as escovas foram colocadas em tubos contendo 10ml de CaSaB e incubadas a 37ºC por três a quatro dias. A contagem das colônias/biofilmes formados sobre as cerdas foi realizada em estereomicroscópio sob luz refletida. O Periogard®, o Brushtox® e a solução experimental reduziram/eliminaram a formação de colônias/biofilmes sobre as cerdas das escovas. Entretanto, o Periogard® e a solução experimental foram mais eficazes que o Brushtox®. Frente aos resultados obtidos, concluiu que as escovas

dentais de crianças tornaram-se contaminadas por estreptococos do grupo mutans após uma única escovação e que, para a desinfecção destas escovas, o Periogard® e a solução experimental foram mais eficazes do que o Brushtox®. Sugeriu que os Odontopediatras recomendem a seus pacientes a desinfecção das escovas dentais, após o uso, com Periogard® ou a solução experimental, sob a forma de spray.

Ayşegüi et al. (2007) avaliaram a contaminação de escovas dentais utilizadas por 24 crianças (sete anos) por estreptococos mutans e a eficácia de uma solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (sob a forma de spray e pela técnica de imersão por duas horas) na desinfecção destas escovas. As crianças utilizaram as escovas por cinco dias consecutivos. Posteriormente, as escovas foram divididas em três grupos e submetidas às técnicas de desinfecção. Após a desinfecção, as escovas foram colocadas em tubos contendo 10,0ml de caldo SB_{20} e incubadas a 37ºC por 4 dias. O biofilme nas cerdas das escovas foi avaliado em estereomicroscópio. Ambas as técnicas de desinfecção foram eficazes em eliminar a formação de biofilme de estreptococos mutans nas cerdas das escovas.

Mehta, Sequeira e Bhat (2007) avaliaram a contaminação bacteriana de escovas dentais utilizadas por 10 estudantes (24 a 27 anos) e a eficácia de uma solução de gluconato de clorexidina a 0,2% e do Listerine® na desinfecção destas escovas. A desinfecção foi realizada pela técnica da imersão por 12 horas. Os indivíduos utilizaram as escovas dentais por uma semana e realizavam a desinfecção das mesmas diariamente. Após uma semana, as escovas foram colocadas em tubos contendo 10,0ml de PBS e agitadas por cinco minutos. Após a diluição decimal seriada, 10,0µl de cada diluição foram semeados em ágar sangue e incubados a 37ºC por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias e a identificação. No grupo controle, sete escovas dentais estavam contaminadas. As bactérias isoladas foram: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter* spp. e estreptococos viridans. A solução de clorexidina foi eficaz em eliminar o crescimento bacteriano. O Listerine®, por sua vez, não eliminou o crescimento bacteriano em todas as escovas dentais.

Em 2008, Nascimento et al. avaliaram a eficácia do Periogard® e do Plax®, sob a forma de spray, em inibir a formação do biofilme de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais utilizadas por 53 estudantes universitários. Como grupo controle foi utilizada a água destilada esterilizada. Em cada uma das três etapas do estudo, os estudantes realizaram a escovação dental sem dentifrício,

por dois minutos. As escovas foram enxaguadas e cada solução borrifada seis vezes sobre as cerdas. Após um período de três horas à temperatura ambiente, as escovas foram colocadas em tubos contendo 10,0ml de CaSaB e incubadas a 37ºC por três a quatro dias. A contagem das colônias/biofilmes formadas sobre as cerdas foi realizada em estereomicroscópio sob luz refletida. O Periogard® e o Plax®, em spray, reduziram/eliminaram a formação de biofilme sobre as cerdas das escovas. Entretanto, o Periogard® foi mais eficaz que o Plax®.

2.3 Biofilmes formados por *Candida* spp.

A formação de biofilme é o maior fator de virulência do gênero *Candida* (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). A *C. albicans*, por exemplo, é capaz de formar biofilme em quase todos os dispositivos médicos (NETT; ANDES, 2006).

Segundo Kojic e Darouiche (2004), os biofilmes formados por *C. albicans* são mais estudados do que os formados por outras *Candida* spp. O biofilme de *C. albicans* se desenvolve em três fases: na fase inicial as células leveduriformes se aderem à superfície do substrato; na fase intermediária ocorre a formação da matriz, de hifas e pseudohifas; e na fase de maturação ocorre um aumento da matriz resultando em uma estrutura tridimensional (CHANDRA et al., 2001; HAWSER; DOUGLAS, 1994).

A aderência é inicialmente mediada por interações inespecíficas (como as forças eletrostáticas e hidrofóbicas) entre as células e o substrato (DONLAN; COSTERTON, 2002). Posteriormente, ocorre a aderência específica por meio da expressão de moléculas que ocasionam uma aderência mais forte (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008).

Biofilmes maduros apresentam células leveduriformes e pseudohifas embutidas em uma matriz de polissacarídeos (CHANDRA et al., 2001), carboidratos, proteínas e componentes desconhecidos (KOJIC; DAROUICHE, 2004). As células leveduriformes formam uma camada aderida à superfície, enquanto que as pseudohifas compõem a camada externa (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; CHANDRA et al., 2001).

As células embutidas no biofilme apresentam propriedades fenotípicas diferentes das células planctônicas (NETT; ANDES, 2006). Um exemplo é a resistência aumentada aos agentes antimicrobianos (BAILLIE; DOUGLAS, 2000).

A formação e a estrutura dos biofilmes de *Candida* spp. são influenciadas por diversos fatores, como a natureza da superfície de contato, os fatores ambientais e as espécies de *Candida* envolvidas (KOJIC; DAROUICHE, 2004; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008).

Para o estudo da formação do biofilme por *C. albicans*, diversos materiais foram utilizados, como cateteres e próteses totais, os quais foram incubados em um meio de cultura (KUMAMOTO, 2002). Entretanto, a natureza da superfície de contato influencia na formação do biofilme (NETT; ANDES, 2006). Alguns materiais podem sustentar o crescimento de um biofilme espesso, o que não ocorre com outros materiais (HAWSER; DOUGLAS, 1994). Por exemplo, biofilmes formados em próteses totais de polimetilmetacrilato são muito mais delgados do que os formados em cateteres de elastômero de silicone (CHANDRA et al., 2001). A aspereza da superfície e a hidrofobicidade aumentada contribuem para a formação do biofilme (NETT; ANDES, 2006).

Meios de cultura com altas concentrações de glicose otimizam a formação de biofilmes (HAWSER; DOUGLAS, 1994), particularmente por *C. parapsilosis*, espécie envolvida em infecções relacionadas a dispositivos médicos em pacientes que recebem nutrição parenteral (SHIN et al., 2002). Entretanto, a adição de sacarose ou maltose no meio de cultura aumenta mais a atividade metabólica no biofilme de *C. albicans* do que a adição de glicose (PARAHITIYAWA et al., 2006). A glicose, por sua vez, aumenta mais esta atividade metabólica do que a frutose ou a lactose (PARAHITIYAWA et al., 2006).

Em um estudo *in vitro*, Seneviratne et al. (2009) avaliaram o coeficiente de difusão da glicose, galactose e sacarose através do biofilme de *C. albicans* e demonstraram que a galactose apresentou o coeficiente de difusão mais alto, ou seja, ela difundiu melhor através do biofilme do que a glicose ou a sacarose.

Segundo Kojic e Darouiche (2004), a agitação suave aumenta a formação do biofilme por *Candida* spp. Isso também ocorre *in vivo*, como na circulação e no sistema urinário, o que favorece a formação do biofilme quando dispositivos médicos são inseridos (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

A maioria das espécies de *Candida* é capaz de formar biofilme *in vitro*, e os biofilmes de *C. albicans* são mais complexos morfologicamente do que os biofilmes de *C. parapsilosis*, os quais são compostos apenas por um conglomerado de blastoconídios (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

Em um estudo *in vitro*, Parahitiyawa et al. (2006) demonstraram algumas diferenças entre os biofilmes formados por cinco espécies de *Candida* (*C. albicans* ATCC 90028, *C. dubliniensis* ATCC MYA646, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. tropicalis* ATCC 13803) em um sistema denominado *Calgary biofilm device* (CBD), o qual é constituído de 96 pinos de poliestireno, que se encaixam em 96 poços. O biofilme do microrganismo estudado se forma sobre os pinos. A *C. krusei* foi a espécie que formou o biofilme mais espesso, o qual apresentava várias camadas de pseudohifas embutidas em uma matriz de polímeros extracelulares. Os biofilmes formados pela *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* apresentavam grupos de células leveduriformes embutidas na matriz. A estrutura do biofilme de *C. dubliniensis* apresentava características celulares semelhantes ao biofilme maduro de *C. albicans.* Entretanto, a *C. dubliniensis* produziu um biofilme com mais agregados de células e mais polímeros extracelulares. O biofilme formado pela *C. glabrata* era constituído de cadeias de células com vários blastoconídios embutidos na matriz de polímeros extracelulares.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Isolar e identificar *Candida* spp. de escovas dentais utilizadas por estudantes universitários.
- Avaliar a eficácia do Periogard® e do Neem Sattiva®, sob a forma de spray, na desinfecção das escovas dentais supracitadas.
- Determinar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, do Periogard®, do Neem Sattiva® e da solução de gluconato de clorexidina a 0,5% por meio da Diluição Inibitória Máxima (DIMax).
- Avaliar a capacidade de *Candida* spp. formar biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas (náilon) e hastilhas (polietileno de baixa densidade) de escovas dentais.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Estudo clínico randomizado

4.1.1 Seleção da amostra

O projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (Protocolo CEP / FCFRP nº 76). Após a aprovação do Comitê de Ética (Anexo A), os voluntários preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Participaram do estudo 61 estudantes (18 a 22 anos de idade), de ambos os gêneros, matriculados no 2º período do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FORP-USP). Os critérios de inclusão foram: não estar fazendo uso de antibióticos, antifúngicos ou antissépticos bucais por um período mínimo de 30 dias; não estar sendo submetido a tratamento odontológico e não apresentar lesões visíveis nas mucosas.

4.1.2 Soluções avaliadas

No estudo clínico randomizado foram avaliados dois antissépticos bucais: o Periogard® (Colgate-Palmolive - Indústria e Comércio LTDA. - São Bernardo do Campo - SP), à base de clorexidina, e o Neem Sattiva® (Floresça - Indústria e Comércio de Cosméticos LTDA. - Aparecida de Goiânia - GO), à base de neem, própolis, alcaçuz, óleo de eucalipto e óleo de menta (tabela 1). A água destilada esterilizada foi utilizada como controle. O Periogard®, o Neem Sattiva® e a água destilada esterilizada foram colocados em frascos individuais de plástico, sob a forma de spray, codificados de acordo com a solução acondicionada.

Tabela 1 – Composição e procedência dos antissépticos bucais avaliados

Antisséptico avaliado	Procedência	Composição
Periogard®	Colgate-Palmolive - Indústria e Comércio LTDA	- Gluconato de clorexidina a 0,12%* - Água - Glicerina - Etanol - Polisorbato 20 - Composição aromática com sabor predominante de menta - Sacarinato de sódio - FD&C Blue nº 1
Neem Sattiva®	Floresça - Indústria e Comércio de Cosméticos LTDA	- Tintura de neem 1,0%* - Tintura de própolis 2,0%* - Extrato de alcaçuz 2,0%* - Óleo de eucalipto 0,10%* - Óleo de menta 0,10%* - Ácido cítrico - Polisorbato 60 - Álcool etílico 96º GL - Sorbitol - Metil parabeno - Propil parabeno - BHT - EDTA - Água Deionizada

*Componentes ativos

4.1.3 Formação dos grupos experimentais

Os indivíduos foram alocados por sorteio (aleatorização), em três grupos, utilizando a tabela de números ao acaso (Anexo B) conforme Costa Neto (1977). O estudo foi realizado em três etapas, com intervalo de uma semana entre cada etapa. As três soluções foram utilizadas em todas as etapas, por grupos de indivíduos diferentes, para minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados (tabela 2).

Tabela 2 – Randomização dos 61 indivíduos em três grupos, nas três etapas do estudo

Grupos	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa
Grupo I (25 indivíduos)	Água	Neem Sattiva®	Periogard®
Grupo II (17 indivíduos)	Periogard®	Água	Neem Sattiva®
Grupo III (19 indivíduos)	Neem Sattiva®	Periogard®	Água

4.1.4 Escovação dentária e aplicação dos antissépticos bucais

Os voluntários realizaram as escovações após as suas atividades didáticas (aulas práticas de Microbiologia no Bloco M, sala 15-A, FCFRP). Em cada etapa do estudo, eles receberam escovas dentais novas Sorriso® Kolynos Original (Colgate-Palmolive - Indústria e Comércio LTDA. - São Bernardo do Campo - SP) e realizaram a escovação dentária sem dentifrício. Considerando-se que eram alunos de Odontologia, não se realizou a padronização da técnica de escovação. O tempo de escovação foi de dois minutos, padronizados com o uso de cronômetro digital. Após a escovação, cada participante efetuou a lavagem e secagem da escova de maneira habitual. As escovas foram recolhidas, codificadas e a solução correspondente em frasco spray borrifada (por um único profissional) sobre as cerdas de cada escova por seis vezes (volume de aproximadamente 0,6ml) a uma distância de 5 a 10cm entre a cabeça da escova e o frasco spray. Durante a borrifagem, as escovas foram mantidas em posição vertical, com a cabeça para cima.

Após a aplicação do spray, foi efetuada a eliminação do excesso de solução, batendo a escova levemente contra a borda da pia. As escovas foram fixadas (em posição vertical, com a cabeça para cima) em um dispositivo feito de espuma de poliuretano com orifício, o qual foi colocado em contêiner de papelão e levado ao laboratório de Microbiologia da FCFRP-USP no Bloco A - Superior, sala 093A-A. As escovas foram mantidas no contêiner por quatro horas à temperatura ambiente para simular o intervalo médio entre as escovações.

4.1.5 Meios de cultura utilizados

4.1.5.1 Caldo *Letheen* Modificado (Difco™) com 4,0% de glicose (Analítica)

Este meio de cultura foi utilizado para neutralizar os agentes antimicrobianos presentes nos antissépticos bucais avaliados e permitir a formação do biofilme de *Candida* spp.

Composição:

Caldo *Letheen*	26,7g
Triptona	5,0g
Peptona proteose n° 3	10,0g
Extrato de levedura	2,0g
Bissulfito de sódio	0,1g
Glicose ..... .Analítica.....	40,0g
Água destilada	1000,0ml

Composição do Caldo *Letheen* por litro:

Extrato de carne	5,0g
Polisorbato 80	5,0g
Lecitina	0,7g
Cloreto de sódio	5,0g

O meio de cultura foi pesado e colocado em um cálice. A glicose também foi pesada e colocada no cálice. A seguir, foi adicionada a água destilada e o meio foi homogeneizado e distribuído em tubos de ensaio de 25x150mm (10,0ml em cada tubo) e autoclavado a 120ºC por 20 minutos.

4.1.5.2 CHROMagar™ Candida (CHROMagar, Paris - França)

O CHROMagar™ Candida foi utilizado para o isolamento e diferenciação de espécies de *Candida*.

Composição:

Peptona 10,2g
Mistura cromogênica 22,0g
Cloranfenicol 0,5g
Ágar 15,0g
Água destilada 1000,0ml

O meio de cultura foi pesado, colocado em balão de Erlenmeyer, adicionado de água destilada, fervido até fusão completa do ágar sob agitação constante e resfriado a cerca de 50°C para distribuição. Foram distribuídos 5,0ml de meio em cada placa de Petri (15x50mm) em câmara de Fluxo Laminar (VECO - Indústria Brasileira - Campinas-SP).

4.1.5.3 Ágar Sabouraud dextrose (Difco™)

O ágar Sabouraud dextrose foi utilizado para o isolamento de leveduras que cresceram nas cerdas das escovas dentais e para subcultivar as colônias que desenvolveram no CHROMagar™ Candida, para manutenção das cepas. Este meio também foi utilizado para a realização do teste de crescimento a 37 e 42°C e para o teste da DIMax.

Composição:

Peptona micológica 10,0g
Glicose 40,0g
Ágar 15,0g
Água destilada 1000,0ml

O meio de cultura foi pesado, colocado em balão de Erlenmeyer, adicionado de água destilada e autoclavado a 120ºC por 20 minutos. Após a esterilização, foi mantido em banho-maria para resfriar até cerca de 50°C para distribuição em placas de Petri (20x100mm) em câmara de Fluxo Laminar (para o isolamento de leveduras que cresceram nas cerdas das escovas dentais e para o teste de crescimento a 37 e 42°C).

Quando este meio foi utilizado para subcultivar as colônias que desenvolveram no CHROMagar™ Candida, o meio foi pesado, adicionado de água destilada e fervido até a dissolução completa. Após a distribuição em tubos de ensaio de 16x160mm (cerca de 6,0ml em cada tubo), foi autoclavado a 120ºC por 20 minutos e inclinado em um apoio de madeira até a solidificação.

4.1.5.4 Ágar Fubá com *Tween* 80

Este meio de cultura foi utilizado para o estudo da micromorfologia das leveduras.

Composição:

Fubá de milho amarelo	..... Kinino®.....	40,0g
Ágar	……..... Oxoid.....	20,0g
Tween 80	..... Inlab.....….	10,0ml
Água destilada	.....	1000,0ml

O fubá foi suspenso em 800,0ml de água destilada, aquecido em banho-maria sob agitação frequente durante uma hora, filtrado em gaze dobrada em quatro vezes e mantido em repouso para decantação. O ágar foi fundido separadamente em 200,0ml de água destilada. O *Tween* 80 e o filtrado de fubá foram adicionados ao ágar. O volume foi completado e o pH acertado em 6,6-6,8. O meio foi distribuído em Erlenmeyer de 50,0ml, autoclavado a 120ºC por 20 minutos e armazenado. No momento do uso, o meio foi fundido e utilizado no microcultivo para o estudo da micromorfologia das leveduras.

4.1.5.5 Meio de cultura para o teste de fermentação de carboidratos

Composição:

Peptona	.....…… Vetec…….....	7,5g
Extrato de leveduras	..... Biobrás.....	4,5g
Água destilada	.....	1000,0ml

Os componentes foram dissolvidos na água destilada. Após homogeneização, o meio foi equitativamente distribuído em balões. Em cada balão, foi adicionado um

dos seguintes carboidratos: glicose (Analítica), maltose (Analítica), sacarose (União) ou lactose (Oxoid®), em quantidades suficientes para concentrações finais a 2,0%. Cerca de 3,5ml do meio foram distribuídos em tubos de 12x125mm, contendo tubos de Durhan em posição invertida. A seguir, os tubos foram tamponados, codificados e autoclavados a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, os tubos foram resfriados em banho de gelo para evitar a caramelização dos açúcares.

4.1.5.6 Meio C (meio para o teste de assimilação de fontes de carbono)

Composição:

Sulfato de amônia	.....J. T. Baker…	5,0g
Fosfato de potássio monobásico	.....Cinética.....	1,0g
Sulfato de magnésio heptaidratado	.....Merck.....	0,5g
Ágar	.....Oxoid.....	15,0g
Água destilada	.....	1000,0ml

Os componentes foram pesados, adicionados de água destilada e fervidos até a dissolução completa. A seguir, 18,0ml de meio foram distribuídos em tubos de 20x200mm e autoclavados a 120ºC por 20 minutos.

4.1.5.7 Meio N (meio para o teste de assimilação de fontes de nitrogênio)

Composição:

Dextrose	.....Analítica...	20,0g
Fosfato de potássio monobásico	.....Cinética.....	1,0g
Sulfato de magnésio heptaidratado	.....Merck.....	0,5g
Ágar	.....Oxoid.....	15,0g
Água destilada	.....	1000,0ml

Os componentes (exceto a dextrose) foram pesados, suspensos na água destilada e fervidos até a dissolução completa. A seguir, a dextrose foi adicionada e 18,0ml do meio foram distribuídos em tubos de 20x200mm e autoclavados a 120ºC por 20 minutos.

4.1.5.8 Água peptonada a 1,0%

A água peptonada a 1,0% foi utilizada para banhar as cerdas e hastilhas das escovas dentais avaliadas no teste de formação de biofilme, *in vitro*.

Composição:

Peptona bacteriológica .....Biobrás..... 10,0g
Água destilada 1000,0ml

A peptona bacteriológica foi pesada e dissolvida na água destilada. Após homogeneização, 10,0ml do caldo foram distribuídos em tubos de 25x150mm e autoclavados a 120ºC por 20 minutos.

4.1.5.9 Caldo Sabouraud dextrose com 4,0% de sacarose

O caldo Sabouraud dextrose com 4,0% de sacarose foi utilizado na formação do biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais pelas *Candida* spp.

Composição:

Peptona bacteriológica .....Biobrás..... 10,0g
Glicose .....Analítica..... 40,0g
Sacarose .....União..... 40,0g
Água destilada 1000,0ml

Os componentes foram pesados e dissolvidos na água destilada. Após homogeneização, 10,0ml do meio foram distribuídos em tubos de 25x150mm e autoclavados a 120ºC por 20 minutos.

4.1.6 Processamento microbiológico

Após quatro horas à temperatura ambiente, cada escova dental foi colocada em um tubo de ensaio de 25x150mm contendo 10,0ml de Caldo *Letheen* Modificado com glicose e incubada a 35ºC por 10 dias. Após o período de incubação, o biofilme microbiano das cerdas foi raspado com uma alça bacteriológica e semeado por esgotamento em ágar Sabouraud dextrose e CHROMagar™ Candida. Após a

incubação a 35ºC por 48 horas, foi realizada a análise da macromorfologia das colônias.

Ao menos duas colônias do mesmo aspecto macromorfológico foram subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35ºC por 24 horas. As leveduras foram identificadas de acordo com a metodologia clássica (SIDRIM; ROCHA, 2004), utilizando os seguintes testes: micromorfologia em ágar fubá com *Tween*-80, formação do tubo germinativo em soro humano, assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, fermentação de carboidratos e crescimento a 37 e 42°C.

- **Estudo da micromorfologia**: O meio ágar fubá com *Tween* 80 foi fundido e resfriado à aproximadamente 50°C e 3,0ml foram depositados sobre uma lâmina para obtenção de uma camada espessa. Após a solidificação do meio, foram feitas duas estrias paralelas na superfície do meio e semeadura em ziguezague. A seguir, o inóculo foi coberto com lamínula esterilizada e incubado em câmara úmida (placa de Petri com um pequeno chumaço de algodão embebido em água destilada esterilizada) a 30°C durante 72-96 horas. A lâmina foi examinada ao microscópio óptico (Nikon - Japão) em objetiva de 40X, com o intuito de se observar as seguintes estruturas: células leveduriformes, pseudomicélio, micélio e clamidoconídios.

- **Formação do tubo germinativo**: as leveduras foram suspensas em 0,5ml de soro humano (procedente do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP) e incubadas a 37°C em banho-maria durante três horas. A seguir, uma gota da suspensão foi colocada em uma lâmina, recoberta com lamínula e examinada ao microscópio óptico para pesquisa de tubo germinativo característico de *C. albicans*.

- **Testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma)**: foi preparada uma suspensão de leveduras (cultura de 24 horas) em um tubo de ensaio de 15x125mm contendo 5,0ml de água destilada esterilizada e 50,0µl de extrato de levedura a 10,0%, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de McFarland. A seguir, foi transferido o volume de 1,5ml da suspensão para cada tubo de ensaio contendo 18,0ml do meio C fundido e mantido à aproximadamente 50°C. A seguir, o meio foi homogeneizado e vertido em placa de Petri (20x100mm) esterilizada e,

após a solidificação, foram depositadas alíquotas de cerca de 2,0mg de carboidratos em pontos equidistantes. Foram utilizados os seguintes carboidratos: glicose (Analítica), maltose (Analítica), sacarose (União), lactose (Oxoid®), celobiose (Difco), rafinose (Difco), ramnose (Merck), trealose (Difco) e melibiose (Sigma®).

Para assimilação de fontes de nitrogênio, 1,0ml da suspensão foi transferido para cada tubo de ensaio contendo 18,0ml do meio N fundido e mantido à aproximadamente 50°C. A seguir, o meio foi homogeneizado e vertido em placa de Petri (20x100mm) esterilizada e, após a solidificação, foram depositadas alíquotas de cerca de 2,0mg de peptona (Vetec) e nitrato de potássio (J. T. Baker).

Após a incubação a 30°C durante 48 a 72 horas, foi realizada a leitura considerando o teste positivo quando da formação de um halo de crescimento ao redor do ponto de aplicação do carboidrato ou da fonte de nitrogênio, e negativo na ausência deste halo.

- **Testes de fermentação de carboidratos (zimograma)**: com o auxílio de uma agulha, a levedura foi inoculada em tubos de ensaio de 12x125mm contendo o respectivo carboidrato (glicose, maltose, sacarose ou lactose) e um tubo de Durhan em posição invertida. A incubação foi a 37°C durante 30 dias, com leituras diárias.

- **Crescimento a 37 e 42°C**: esse teste foi realizado para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, pois ambas são positivas para o teste do tubo germinativo e produzem clamidoconídios. Foi preparada uma suspensão de leveduras em solução fisiológica a 0,85% esterilizada equivalente ao padrão 2 da escala de McFarland. Alíquotas de 5,0µl da suspensão foram depositadas em placas de ágar Sabouraud dextrose (cada placa contendo 10 inóculos de diferentes cepas) e incubadas a 37 e 42°C por 48 horas.

A figura 1 apresenta o fluxograma da metodologia empregada no estudo clínico randomizado.

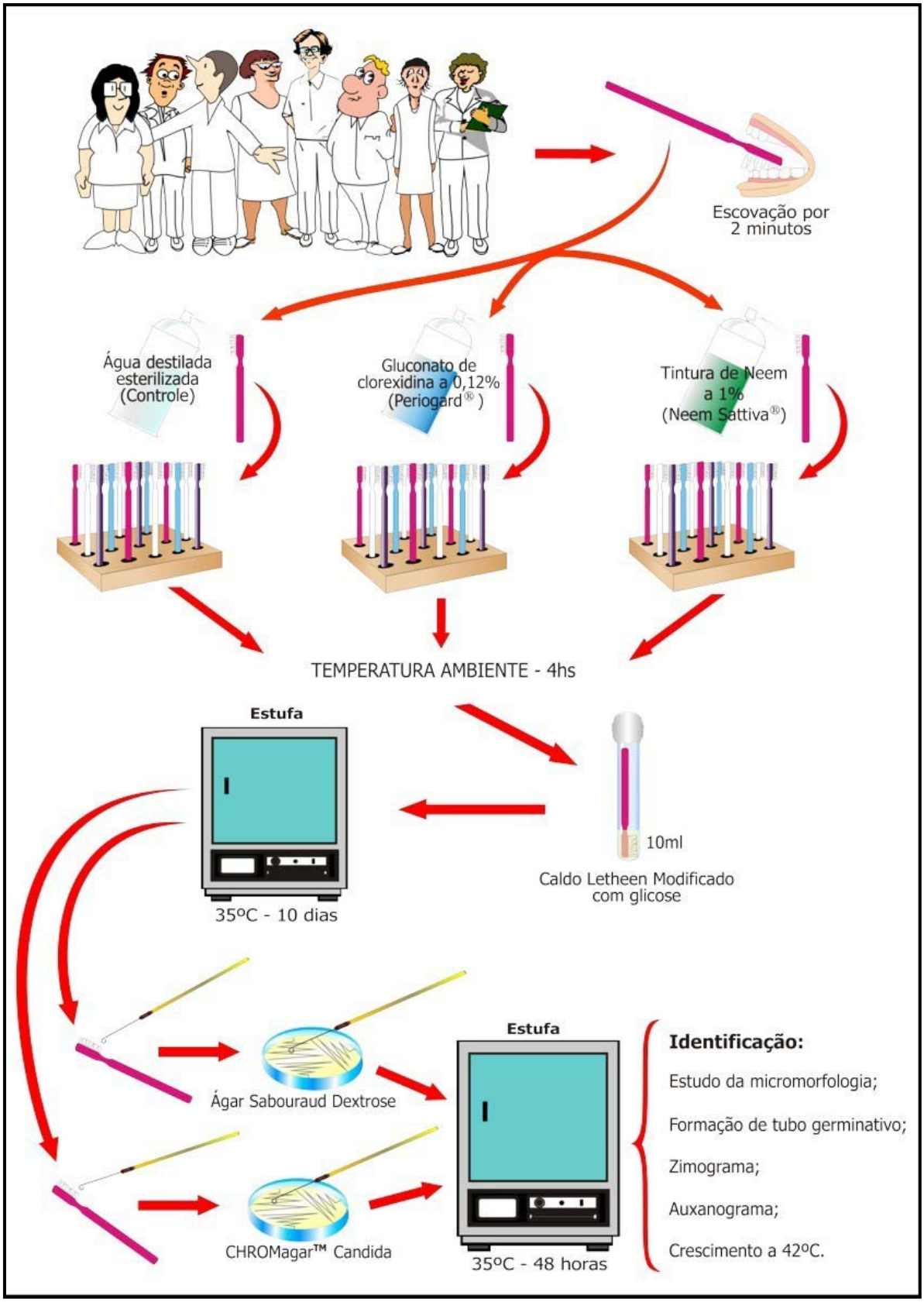

Figura 1. Fluxograma da metodologia empregada no estudo clínico randomizado.

4.2 Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos

Para o teste da DIMax, *in vitro*, foram avaliados os seguintes antissépticos: o Neem Sattiva®, o Periogard® e uma solução de gluconato de clorexidina a 0,5% (Aquilea - Farmácia de Manipulação - Ribeirão Preto - SP).

A determinação da DIMax foi realizada em duplicata utilizando o método da diluição em ágar. As diluições (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640) foram realizadas em tubos de ensaio de 20x200mm. A diluição 1/5 foi preparada adicionando 4,0ml do antisséptico e 16,0ml de ágar Sabouraud dextrose nos tubos 1 e 1'. A diluição 1/10 foi preparada adicionando 2,0ml do antisséptico e 18,0ml de ágar Sabouraud dextrose nos tubos 2 e 2'.

A partir da diluição 1/20, foi realizada a diluição dupla seriada. Nos tubos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 foram adicionados 4,0ml de água destilada esterilizada. No tubo 3 (diluição 1/20) também foram adicionados 4,0ml do antisséptico. Após homogeneização do conteúdo do tubo 3, foram transferidos 2,0ml para o tubo 3' e 4,0ml para o tubo 4 (diluição 1/40). Após homogeneização do conteúdo do tubo 4, foram transferidos 2,0ml para o tubo 4' e 4,0ml para o tubo 5 (diluição 1/80), e assim sucessivamente, até os tubos 8 e 8' (diluição 1/640). O controle foi preparado adicionando 2,0ml de água destilada esterilizada nos tubos C e C'. Posteriormente, 18,0ml de ágar Sabouraud dextrose foram adicionados em cada tubo e vertidos em placas de Petri (20x100mm).

Foi preparada uma suspensão de leveduras (cultura de 24 horas) em solução fisiológica a 0,85% esterilizada equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Foram avaliadas 63 cepas de *Candida* spp., das quais uma era cepa padrão (*C. albicans* ATCC 1023) e 62 (57 *C. albicans*, 4 *C. parapsilosis* e 1 *Candida* sp.) haviam sido isoladas das escovas dos estudantes universitários que participaram do estudo clínico randomizado.

As leveduras foram semeadas utilizando um Aplicador de Steers (STEERS et al., 1959-1960), o qual consiste de duas placas metálicas, uma das quais apresenta 25 poços. Em cada poço foram transferidos 100,0µl da suspensão da levedura. A outra placa apresenta 25 pinos metálicos que encaixam nos poços. Com o auxílio destes pinos, as suspensões das leveduras foram semeadas na superfície do meio de cultura nas placas de Petri contendo as diferentes diluições dos

antissépticos (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640), da maior para a menor dilluição.

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As leituras foram realizadas considerando DIMax a maior diluição do antisséptico capaz de inibir o crescimento de todas as cepas avaliadas, de acordo com Wade e Addy (1992).

A figura 2 apresenta o fluxograma da metodologia empregada no teste da DIMax.

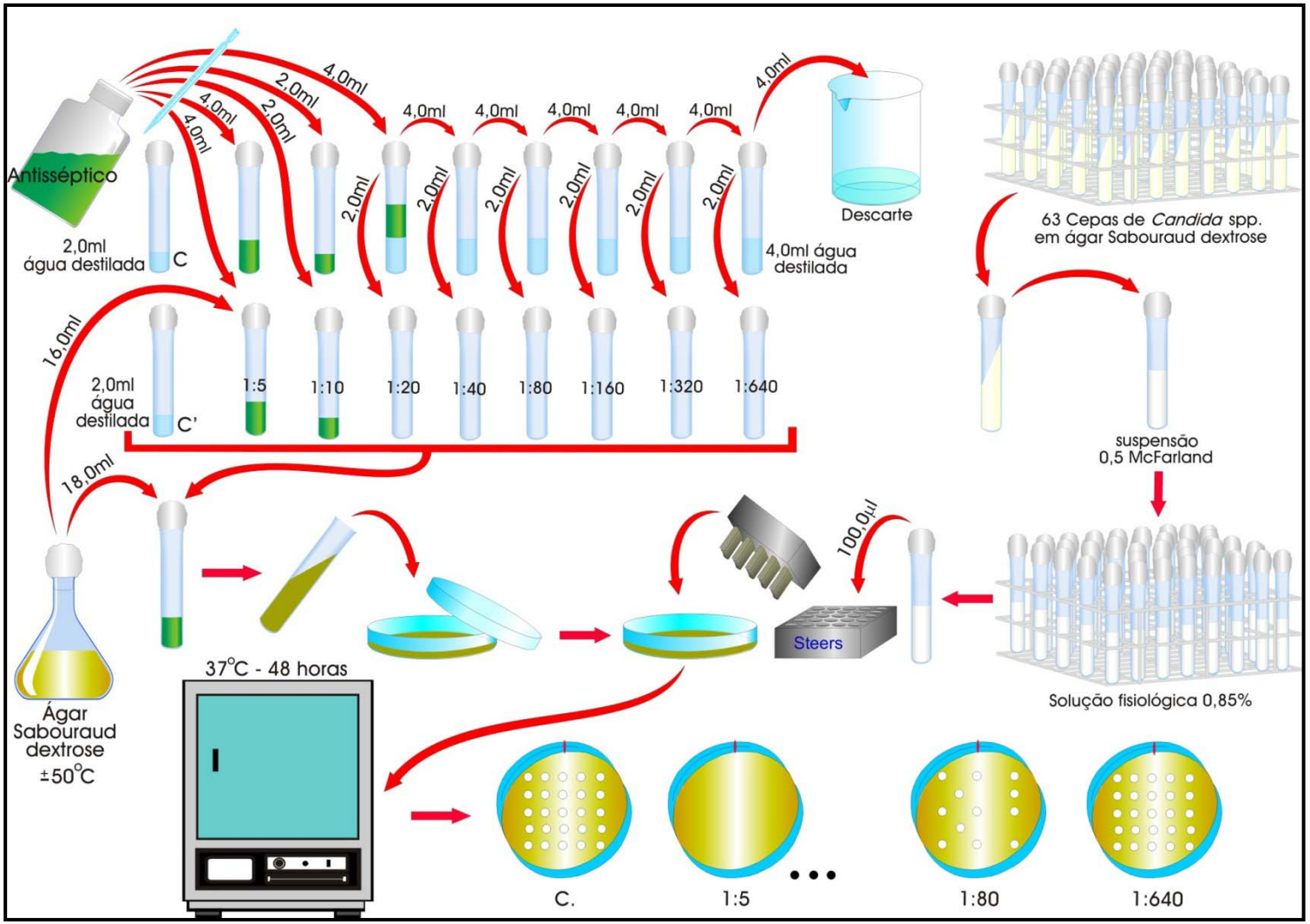

Figura 2. Fluxograma da metodologia empregada no teste da Diluição Inibitória Máxima.

4.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais

Para avaliar a capacidade de *Candida* spp. formarem biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais, foram utilizadas 18 cepas de *C. albicans*, quatro cepas de *C. parapsilosis* e uma cepa de *Candida* sp., as quais haviam sido isoladas das escovas dentais utilizadas por estudantes universitários que participaram do estudo clínico randomizado. Também foi avaliada a cepa padrão *C. albicans* ATCC 1023.

Dois tipos de escovas dentais foram avaliados: escovas convencionais de cerdas de náilon (Sorriso® Kolynos Original - Colgate-Palmolive - Indústria e Comércio LTDA. - São Bernardo do Campo - SP); e escovas Monobloc® da linha Científica® (Dental Line Robodente LTDA. - Ribeirão Preto - SP), constituídas de polietileno de baixa densidade, atóxico e insolúvel em água, que é injetado para formação do cabo, cabeça e hastilhas.

As escovas avaliadas foram previamente imersas em tubos de 25x150mm contendo 10,0ml de água peptonada a 1,0%, retiradas e colocadas em um suporte para a secagem das cerdas. Esse procedimento foi realizado na câmara de Fluxo Laminar para evitar a contaminação das escovas.

Para cada cepa foram avaliadas duas escovas de cada tipo. Como controle negativo foram utilizadas quatro escovas de cada tipo.

As suspensões das leveduras foram preparadas em tubos de ensaio de 20x200mm contendo 20,0ml de solução fisiológica a 0,85% esterilizada, com turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Cada suspensão de levedura foi vertida em uma placa de Petri (20x100mm), onde as cabeças das escovas dentais (duas de cada tipo) foram introduzidas. Dentro da placa de Petri, as cerdas e hastilhas das escovas eram raspadas entre si (duas escovas de cada vez) simulando o movimento de escovação, durante dois minutos. Após o procedimento de contaminação das escovas dentais, cada escova foi introduzida em um tubo de ensaio de 25x150mm contendo 10,0ml de caldo Sabouraud dextrose com 4,0% de sacarose.

Para cada cepa avaliada, uma escova de cada tipo foi incubada à temperatura ambiente por sete dias em uma Mesa com agitação orbital (Marconi - Equipamentos para Laboratório LTDA. - Piracicaba - SP) a 25rpm. Uma escova de cada tipo também foi incubada a 35°C por sete dias sem agitação.

Após o período de incubação, as cerdas e hastilhas das escovas foram avaliadas visualmente para a verificação da formação do biofilme. Foram escolhidas 22 escovas (11 de cada tipo), as quais foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura: oito escovas contaminadas com *C. albicans* (incluindo a cepa padrão), oito escovas contaminadas com *C. parapsilosis*, quatro escovas contaminadas com *Candida* sp. e duas escovas não contaminadas (controle negativo).

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

As escovas selecionadas para a microscopia eletrônica de varredura foram colocadas em tubos de ensaio de 25x150mm contendo 5,0ml de solução de glutaraldeído a 2,0% e 5,0ml de solução de cacodilato de sódio 0,1M. Posteriormente, as escovas foram levadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para processamento e análise em microscópio eletrônico de varredura. Cerca de 18 hastilhas e 3 tufos de cerdas de cada escova foram cortados com gilete, colocados com pinça em frascos e imersos em 1,0ml de solução de tetróxido de ósmio a 2,0% e 1,0ml de tampão cacodilato de sódio 0,2M por duas horas. Após a lavagem em cacodilato de sódio 0,1M (três trocas de 15 minutos cada), as cerdas e hastilhas foram imersas em álcool, nas concentrações de 50, 70, 70, 95, 100 e 100%, sequencialmente, por um período de 15 minutos em cada uma das concentrações de álcool.

As cerdas e hastilhas foram colocadas em um suporte e submetidas à secagem com CO_2, no ponto crítico, em aparelho Bal-Tec CPD 030 (Critical Point Dryer – Fürstentum – Liechtenstein), e montadas em *stubs* metálicos com fita adesiva. Posteriormente, foram submetidas ao processo de metalização em ouro sob vácuo em aparelho Bal-Tec SCD 050 (Sputter Coater - Fürstentum – Liechtenstein). A análise foi efetuada em microscópio eletrônico JSM - 5200 (Jeol Ltd.- Tokyo), a 25kV. Para comprovar a presença ou ausência de biofilme de *Candida* spp., foram efetuadas eletromicrografias das cerdas e hastilhas das escovas, com aumentos variando de 75 a 5000 vezes.

A figura 3 apresenta o fluxograma da metodologia empregada no processamento para microscopia eletrônica de varredura.

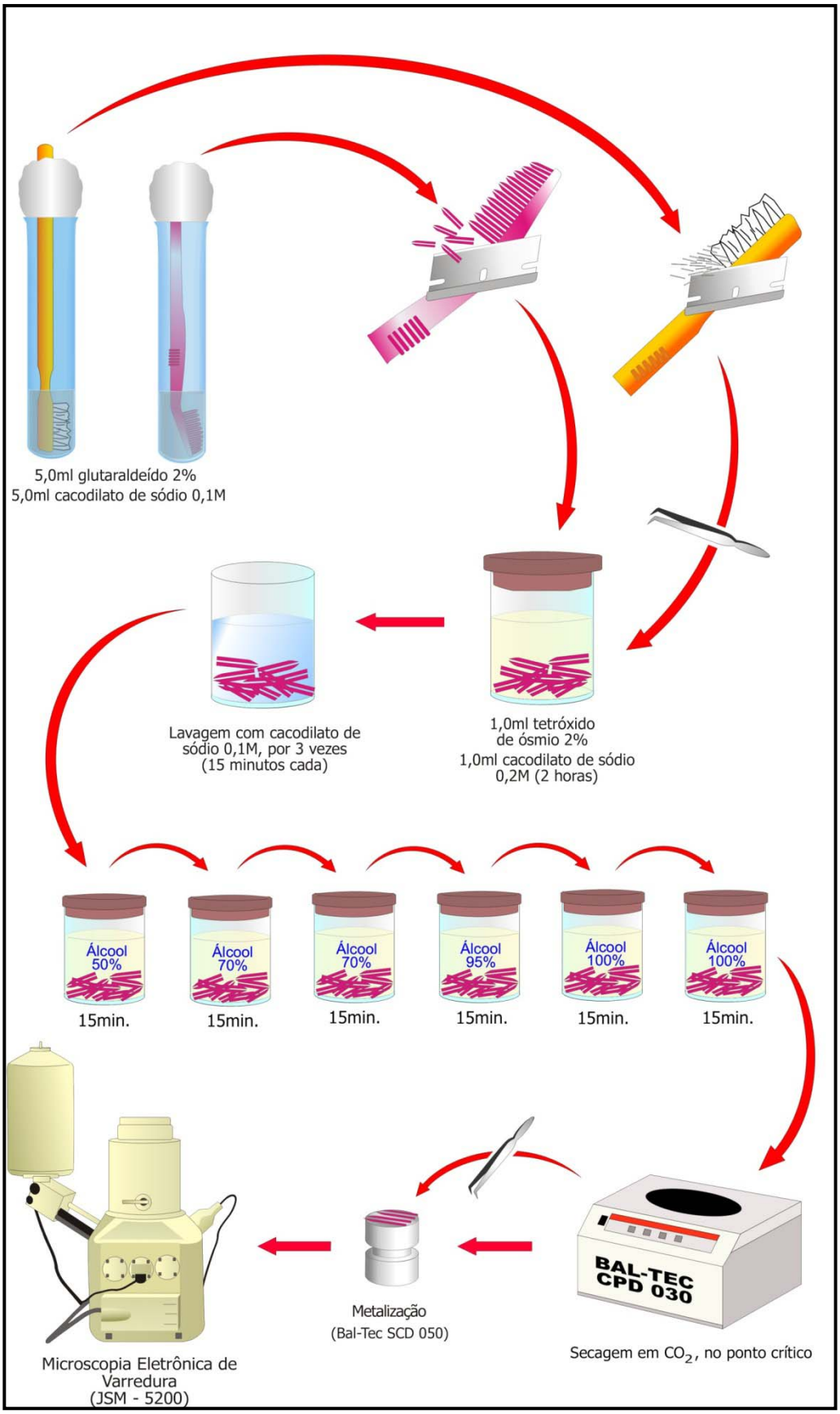

Figura 3. Fluxograma da metodologia empregada no processamento para microscopia eletrônica de varredura.

4.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos no estudo clínico randomizado e no teste da DIMax foi empregado o programa estatístico GMC 2002 (MAIA CAMPOS, 2009).

O teste estatístico não paramétrico de Cochran para amostras vinculadas foi aplicado para comparar as três soluções (água destilada esterilizada, Periogard® e Neem Sattiva®), com relação à eficácia na eliminação do crescimento de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais utilizadas no estudo clínico randomizado. O teste de Cochran foi utilizado porque os resultados constituem dados dicotomizados, representados somente por respostas do tipo “positivo” (+) ou “negativo” (-). Quando o teste de Cochran indicou diferença entre as soluções, aplicou-se o teste dos sinais para verificar entre quais soluções houve diferença (SIEGEL, 1975).

O teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes foi aplicado para verificação de possíveis diferenças entre os três antissépticos (Neem Sattiva®, Periogard® e solução de gluconato de clorexidina a 0,5%) avaliados no teste da DIMax.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Estudo clínico randomizado

5.1.1 Presença de *Candida* spp. nas escovas dentais

Dos 61 indivíduos que iniciaram o estudo, 59 participaram de todas as etapas. Os dois que não participaram de todas as etapas foram excluídos.

No grupo controle, as escovas dentais de 22 (37,3%) indivíduos apresentaram crescimento de *Candida* spp. (tabela 3). Nas escovas de 37 (62,7%) indivíduos não houve o desenvolvimento do microrganismo.

As escovas dentais de cinco indivíduos (indivíduos nº 8, 9, 36, 51 e 53) não apresentaram crescimento de *Candida* spp. no grupo controle, mas o microrganismo foi isolado após o uso do spray de Neem Sattiva® (tabela 3). Em um dos casos (indivíduo nº 8), o microrganismo foi também isolado após o uso do Periogard®. Portanto, nas três etapas do estudo as escovas dentais de 27 (45,8%) indivíduos apresentaram crescimento de *Candida* spp. (tabela 3).

Nos grupos controle e experimentais foram isoladas 62 cepas de *Candida* spp. Destas, 57 (91,9%) eram *C. albicans*, quatro (6,5%) *C. parapsilosis* e uma (1,6%) *Candida* sp. (tabela 4).

No grupo controle, a *C. albicans* estava presente nas escovas dentais de 20 indivíduos (33,9%). A *C. parapsilosis*, por sua vez, estava presente nas escovas de apenas 2 indivíduos (3,4%).

Na escova dental do indivíduo 55, foram isoladas duas espécies de *Candida*: *C. albicans* e *Candida* sp. (tabela 4). A *C. albicans* foi isolada nas 3 etapas do estudo. Entretanto, a *Candida* sp. foi isolada apenas após o uso do spray de Neem Sattiva®.

Tabela 3 – Presença de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais utilizadas por 59 indivíduos nos grupos controle e experimentais

Indivíduo	Água destilada esterilizada	Periogard®	Neem Sattiva®
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	+	+
9	-	-	+
10	-	-	-
11	-	-	-
12	+	+	+
13	+	+	+
14	-	-	-
15	-	-	-
16	+	+	+
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	+	+	+
21	+	-	+
22	-	-	-
23	+	+	+
24	-	-	-
25	-	-	-
26	+	+	+
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	-
32	-	-	-
33	+	+	+
34	+	+	+
35	+	+	+
36	-	-	+
37	-	-	-
38	+	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	+	-	+
42	-	-	-
43	+	+	+
44	-	-	-
45	+	-	+
46	-	-	-
47	+	-	+
48	+	-	+
49	+	+	+
50	+	-	+
51	-	-	+
52	-	-	-
53	-	-	+
54	+	+	+
55	+	+	+
56	+	-	+
57	+	-	-
58	-	-	-
59	-	-	-

Tabela 4 – *Candida* spp. isoladas das cerdas das escovas dentais utilizadas por 27 indivíduos nos grupos controle e experimentais

Indivíduo	Água destilada esterilizada	Periogard®	Neem Sattiva®
8	-	*C. albicans*	*C. albicans*
9	-	-	*C. parapsilosis*
12	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
13	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
16	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
20	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
21	*C. albicans*	-	*C. albicans*
23	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
26	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
33	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
34	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
35	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
36	-	-	*C. parapsilosis*
38	*C. parapsilosis*	-	-
41	*C. albicans*	-	*C. albicans*
43	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
45	*C. albicans*	-	*C. albicans*
47	*C. albicans*	-	*C. albicans*
48	*C. albicans*	-	*C. albicans*
49	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
50	*C. albicans*	-	*C. albicans*
51	-	-	*C. albicans*
53	-	-	*C. albicans*
54	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
55	*C. albicans*	*C. albicans*	*C. albicans*
	-	-	*Candida* sp.
56	*C. albicans*	-	*C. albicans*
57	*C. parapsilosis*	-	-

5.1.2 Desinfecção das escovas dentais com Periogard® e Neem Sattiva®

O spray de Periogard® inibiu o crescimento de *Candida* spp. em nove (40,9%) escovas dentais. As outras 13 (59,1%) escovas apresentaram crescimento do microrganismo (tabela 4).

O spray de Periogard® inibiu o crescimento das duas (100,0%) cepas de *C. parapsilosis* isoladas no grupo controle (tabela 4). Isso indica que essa espécie é suscetível ao gluconato de clorexidina a 0,12%. Com relação às cepas de *C. albicans*, apenas sete (35,0%) foram inibidas pelo Periogard® (tabela 4).

No presente estudo, o spray de Neem Sattiva® apresentou uma baixa atividade contra *Candida* spp., visto que ele inibiu o crescimento das leveduras em

apenas duas (9,1%) escovas dentais. Portanto, 20 escovas (90,9%) apresentaram crescimento do microrganismo (tabela 4).

O spray de Neem Sattiva® inibiu o crescimento das duas (100,0%) cepas de *C. parapsilosis* isoladas no grupo controle (tabela 4). Com relação à *C. albicans* nenhuma das 20 (100,0%) cepas foram inibidas, o que mostra a ineficácia desse antisséptico contra essa espécie (tabela 4).

5.2 DIMax dos antissépticos

O Neem Sattiva® inibiu todos os microrganismos avaliados na diluição 1/10. Portanto, a DIMax do Neem Sattiva® foi de 1/10. O Periogard®, por sua vez, inibiu todos os microrganismos na diluição 1/20. A DIMax da solução de clorexidina a 0,5% foi de 1/40 (tabela 5).

Na diluição 1/40, o Neem Sattiva® inibiu duas cepas de *C. albicans*. Na diluição 1/20, foi inibida a maioria dos microrganismos avaliados (4 cepas de *C. parapsilosis* e 56 cepas de *C. albicans*, incluindo a *C. albicans* ATCC 1023). A *Candida* sp. foi inibida na diluição 1/10.

O Periogard® inibiu uma cepa de *C. parapsilosis* e uma cepa de *C. albicans* na diluição 1/80. Na diluição 1/40 foi inibida outra cepa de *C. parapsilosis* e 37 cepas de *C. albicans* (incluindo a *C. albicans* ATCC 1023). Na diluição 1/20 foram inibidas duas cepas de *C. parapsilosis*, 20 cepas de *C. albicans* e uma cepa de *Candida* sp.

A solução de clorexidina a 0,5% inibiu uma cepa de *C. parapsilosis* na diluição 1/640. O mesmo ocorreu na diluição 1/320, na qual outra cepa de *C. parapsilosis* foi inibida. Na diluição 1/160, foram inibidas as outras duas cepas de *C. parapsilosis* e 23 cepas de *C. albicans* (incluindo a *C. albicans* ATCC 1023). As outras cepas de *C. albicans* foram inibidas nas diluições 1/80 e 1/40. A *Candida* sp. foi inibida na diluição 1/80.

Tabela 5 – Cepas de *Candida* spp. inibidas (de um total de 63 cepas) em cada diluição dos antissépticos avaliados

	Neem Sattiva®				Periogard®				CHX a 0,5%			
	Cepas inibidas		Dados cumulativos		Cepas inibidas		Dados cumulativos		Cepas inibidas		Dados cumulativos	
Diluição	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
1/640	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,6	1	1,6
1/320	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,6	2	3,2
1/160	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	25	39,7	27	42,8
1/80	0	0,0	0	0,0	2	3,2	2	3,2	21	33,3	48	76,2
1/40	2	3,2	2	3,2	38	60,3	40	63,5	15	23,8	63	100,0
1/20	60	95,2	62	98,4	23	36,5	63	100,0				
1/10	1	1,6	63	100,0								
1/5												

CHX: clorexidina.

5.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais

As *Candida* spp. avaliadas foram incapazes de formar biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas de náilon das escovas dentais Sorriso® Kolynos Original (figura 4). Entretanto, elas foram capazes de formar biofilme, *in vitro*, sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®.

Nas cerdas e hastilhas (figura 5) do controle negativo, não houve crescimento microbiano. Com a microscopia eletrônica de varredura, pôde-se observar que as hastilhas apresentavam muitas irregularidades (elevações e depressões) ao longo das mesmas, ao contrário das cerdas de náilon, que são lisas e raramente apresentavam algum defeito.

As diferentes condições de incubação (35°C sem agitação ou à temperatura ambiente sob agitação) não influenciaram na formação ou na estrutura dos biofilmes.

A estrutura do biofilme variou conforme a espécie de *Candida* avaliada. O biofilme de *C. albicans* era formado apenas por células leveduriformes (figura 6 A - F), enquanto que o biofilme de *C. parapsilosis* apresentava células leveduriformes e pseudohifas, ou seja, essa espécie formou um biofilme maduro (figura 7 A - F). A *Candida* sp. formou um biofilme constituído apenas de células leveduriformes, as quais aderiram principalmente nas depressões das hastilhas (figura 8 A - F).

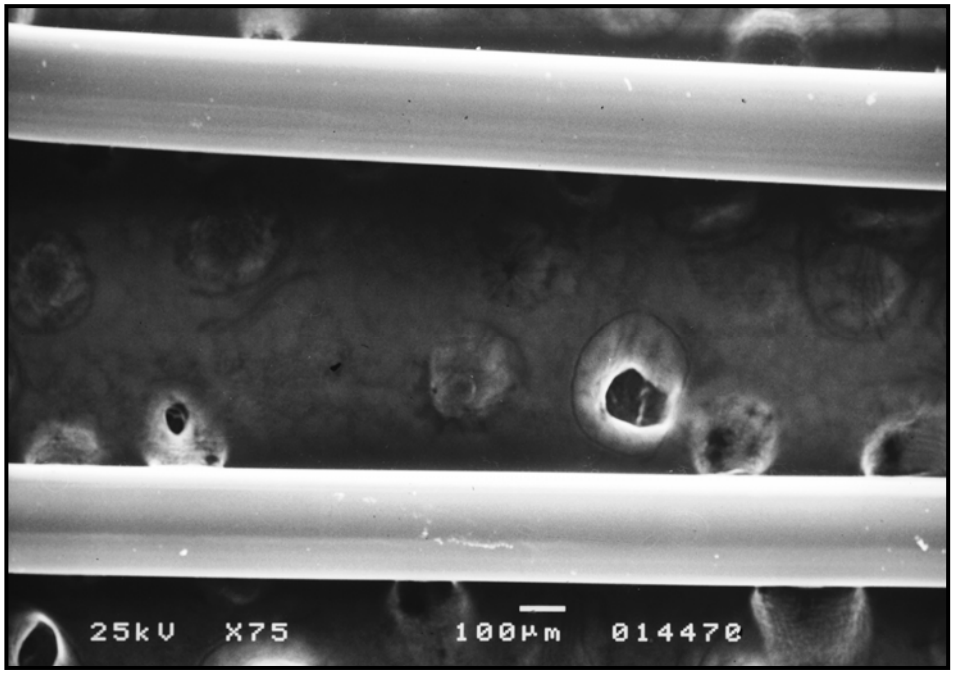

Figura 4. Eletromicrografia evidenciando ausência de biofilme de *C. parapsilosis* sobre as cerdas de náilon da escova dental Sorriso® Kolynos Original, em aumento de 75x.

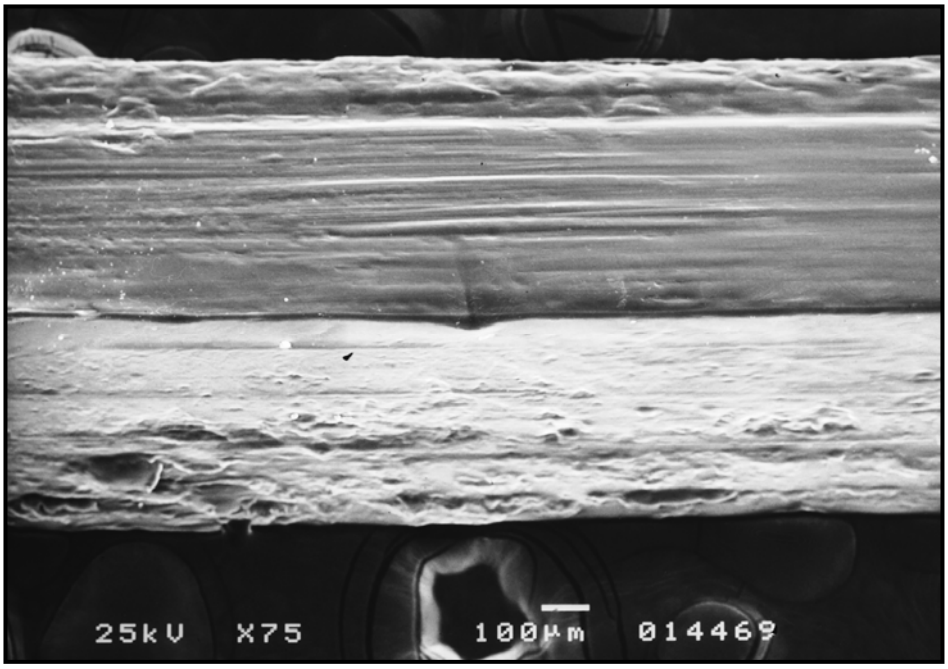

Figura 5. Eletromicrografia evidenciando ausência de microrganismos sobre as hastilhas da escova do controle negativo, em aumento de 75x.

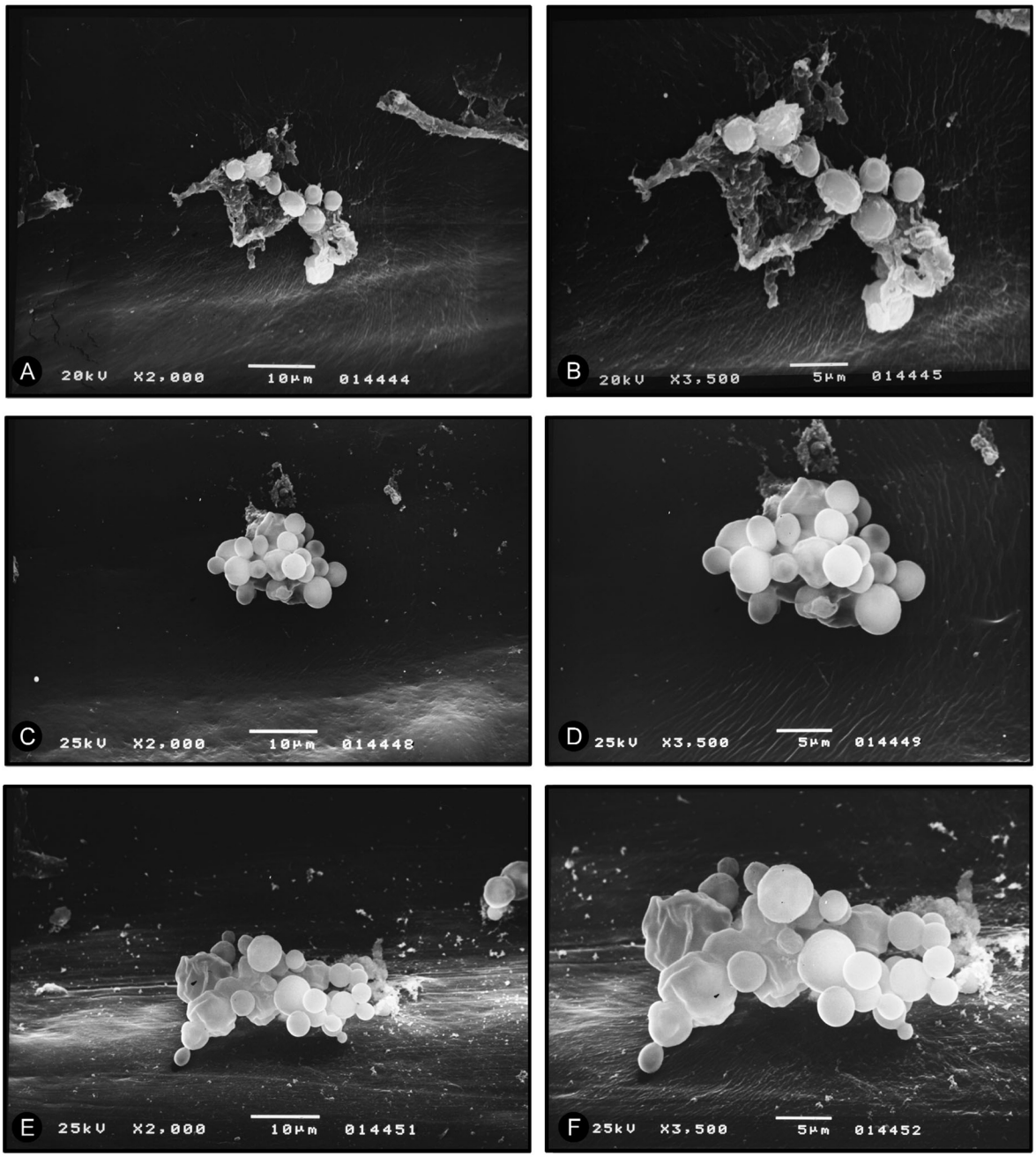

Figura 6. A – F: Eletromicrografias evidenciando biofilmes de *C. albicans* sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®, em aumentos de 2000 e 3500x.

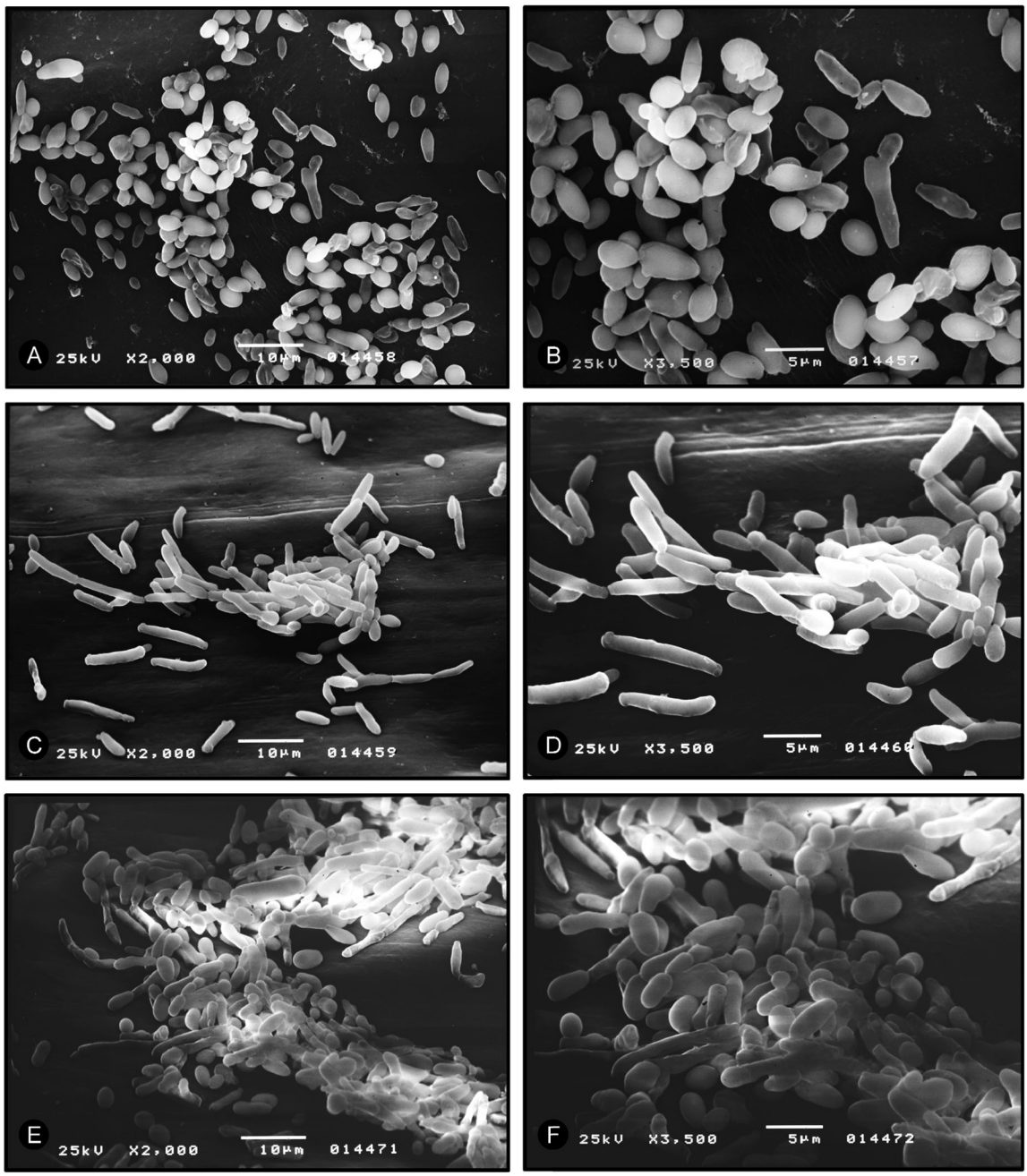

Figura 7. A – F: Eletromicrografias evidenciando biofilmes de *C. parapsilosis* sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®, em aumentos de 2000 e 3500x.

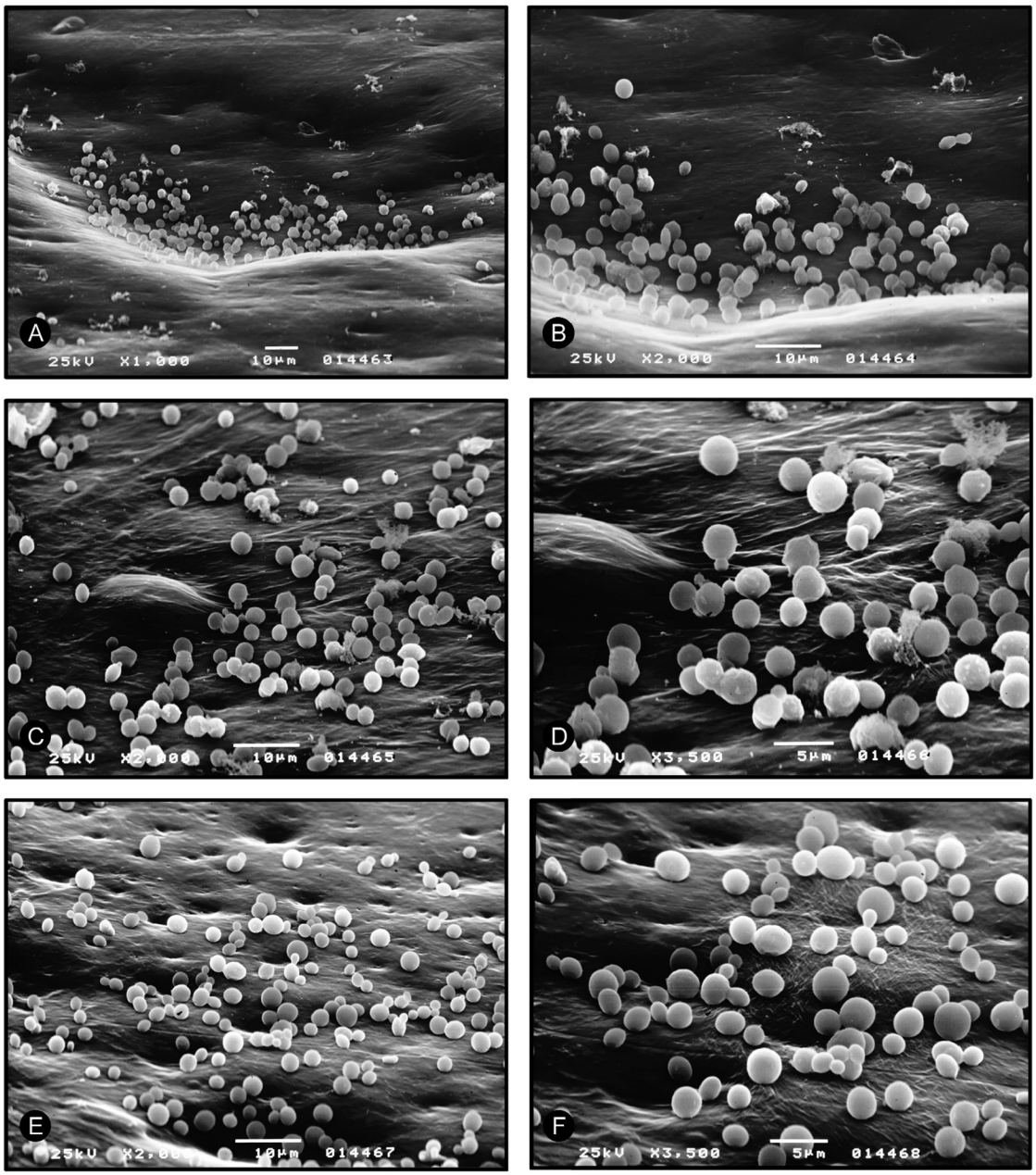

Figura 8. A – F: Eletromicrografias evidenciando biofilmes da *Candida* sp. sobre as hastilhas de polietileno de baixa densidade das escovas Monobloc® da linha Científica®, em aumentos de 1000 a 3500x.

5.4 Análise estatística

Para a realização da análise estatística, os dados obtidos no estudo clínico randomizado foram convertidos (Apêndice B) em valores numéricos 1 (um) nos casos em que as escovas apresentavam crescimento de *Candida* spp. (respostas do tipo "positivo"), e em 0 (zero) nos casos de ausência de crescimento de *Candida* spp. (respostas do tipo "negativo").

Os dados obtidos foram confrontados por meio do teste não paramétrico de Cochran, o qual detectou diferença estatisticamente significante (x^2 = 14,8889; $p<0,01$) entre as três soluções (água destilada esterilizada, Periogard® e Neem Sattiva®).

Como teste adicional comparativo foi aplicado o teste dos sinais. Os resultados das comparações entre as soluções duas a duas encontram-se expressos nas tabelas 6, 7 e 8 (Apêndice C). Verificou-se que houve diferença estatisticamente significante entre as três soluções na inibição do crescimento de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais ($p<0,01$).

A figura 9 apresenta o resultado do teste dos sinais.

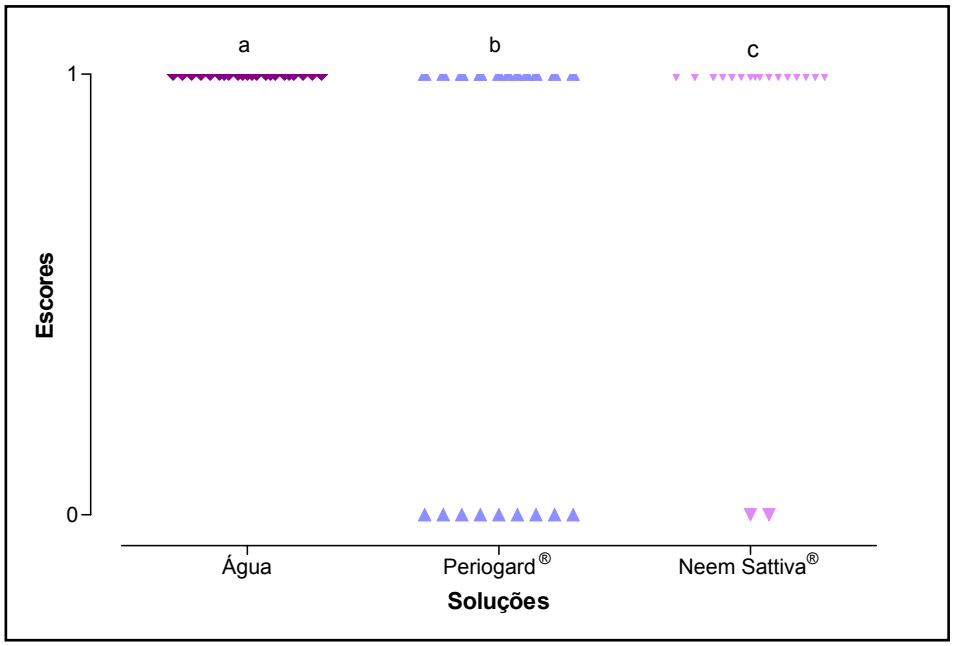

Figura 9. Comparação entre as soluções, em relação à presença ou ausência de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais (teste dos sinais). As letras iguais e diferentes representam resultados estatísticos semelhantes e diferentes, respectivamente.

Com relação à inibição do crescimento de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais, o Periogard® e o Neem Sattiva® apresentaram diferença estatisticamente significante, quando comparados com o grupo controle (água destilada esterilizada). Quando comparados entre si, o Periogard® apresentou melhores resultados que o Neem Sattiva®.

Para a realização da análise estatística, os dados obtidos no teste da DIMax foram convertidos em escores (Apêndice D) determinados da menor para a maior diluição:

- Escore 1: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/5.
- Escore 2: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/10.
- Escore 3: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/20.
- Escore 4: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/40.
- Escore 5: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/80.
- Escore 6: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/160.
- Escore 7: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/320.
- Escore 8: para as cepas de *Candida* spp. inibidas na diluição 1/640.

Os dados obtidos foram confrontados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual detectou diferença estatisticamente significante (x^2 = 139,96; $p<0,01$) entre os três antissépticos (Neem Sattiva®, Periogard® e solução de clorexidina a 0,5%). O resultado da comparação dos antissépticos dois a dois (Apêndice E) evidenciou que houve diferença estatisticamente significante entre o Neem Sattiva® e o Periogard® ($p<0,001$), o Neem Sattiva® e a solução de clorexidina a 0,5% ($p<0,001$) e o Periogard® e a solução de clorexidina a 0,5% ($p<0,001$).

A figura 10 apresenta a média dos escores das diluições dos três antissépticos avaliados.

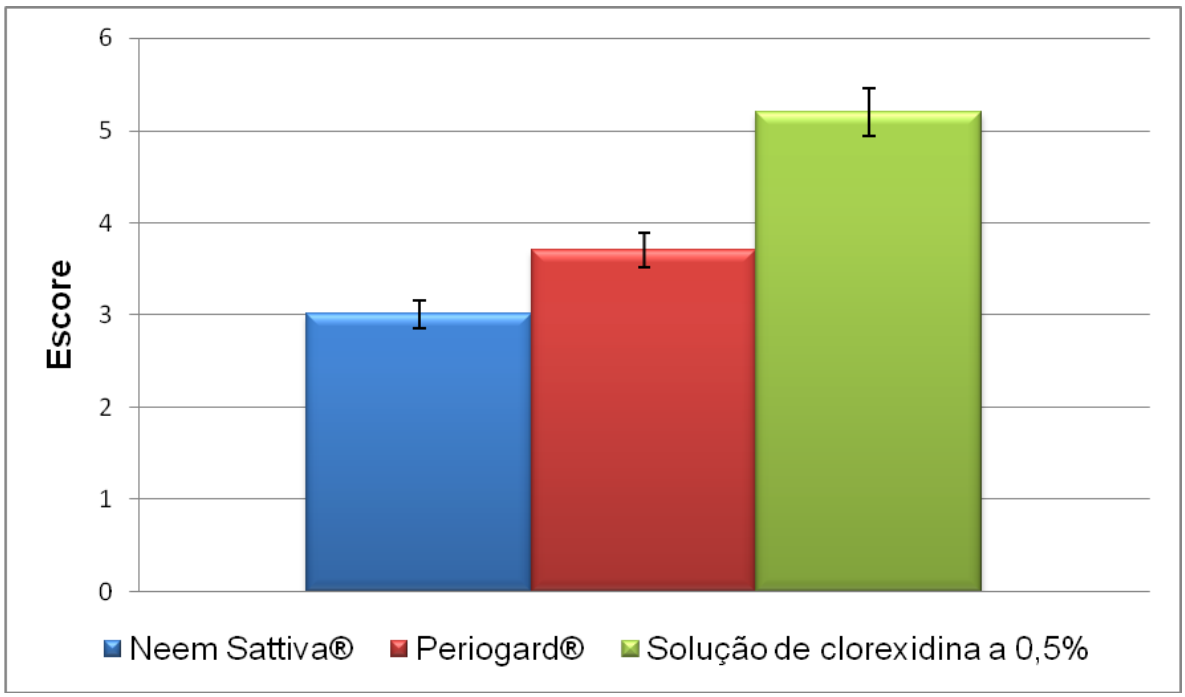

Figura 10. Média dos escores das diluições dos três antissépticos avaliados.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que a solução de clorexidina a 0,5% foi o antisséptico que apresentou maior eficácia antimicrobiana ($p<0,001$). O Periogard®, por sua vez, foi mais eficaz que o Neem Sattiva® ($p<0,001$).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Metodologia

6.1.1 Estudo clínico randomizado

No estudo clínico randomizado, os indivíduos foram alocados por sorteio (aleatorização), utilizando a tabela de números ao acaso (COSTA NETO, 1977), em três grupos. A randomização (alocação aleatória) é o melhor modo de alocar os indivíduos que participarão de um estudo (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1989). O estudo foi randomizado, com o objetivo de minimizar a incorporação de vieses (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 2002), os quais poderiam interferir nos resultados obtidos.

Escovas dentais podem ser contaminadas por bactérias cariogênicas (AYŞEGÜI et al., 2007; BOYLAN et al., 2008; EFSTRATIOU et al., 2007; LIMA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; NELSON-FILHO et al., 2000, 2006; SATO et al., 2005; SVANBERG, 1978), periodontopatogênicas (EFSTRATIOU et al., 2007; MÜLLER; LANGE; MÜLLER, 1989) e outras bactérias encontradas na cavidade bucal (BOYLAN et al., 2008; GLASS; LARE, 1986; MALMBERG et al., 1994; SATO et al., 2005; TAJI; ROGERS, 1998). Além de bactérias, escovas dentais podem ser contaminadas por leveduras (BARBOZA, 2004; MALMBERG et al., 1994; MARCANO, 1981; MOTZFELD et al., 1999; SANCHES et al., 2001; TAJI; ROGERS, 1998; VERRAN et al., 1997), fungos filamentosos (MALMBERG et al., 1994), parasitas intestinais (BORGES et al., 1996; SILVEIRA et al., 2002) e vírus (LOCK et al., 2006).

No presente estudo, foi avaliada a contaminação de escovas dentais por *Candida* spp. O gênero *Candida* compreende a maioria das leveduras isoladas da cavidade bucal (COSTA et al., 2005). Além disso, estas leveduras são os agentes etiológicos da candidose bucal (MARSH; MARTIN, 2005), a qual ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes com HIV/AIDS (BLIGNAUT, 2007; SAMARANAYAKE; HOLMSTRUP, 1989) e pacientes que utilizam drogas imunossupressoras (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990). Além da imunossupressão, há vários outros fatores de risco à candidose bucal: fatores fisiológicos, incluindo extremos de idade e gravidez (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990;

FANELLO et al., 2006); diabetes mellitus (TAPPER-JONES et al., 1981); deficiências nutricionais (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990); câncer (WORTHINGTON; CLARKSON, 2002); e fatores locais, como a xerostomia, câncer bucal, o uso de antibióticos de amplo espectro, corticosteróides, cigarro (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990), próteses totais (BUDTZ-JÖRGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975), etc.

As escovas dentais Sorriso® Kolynos Original foram utilizadas neste estudo porque elas apresentam cerdas macias com pontas arredondadas e cabo anatômico com boa empunhadura.

A escovação dentária foi realizada pelos voluntários de maneira habitual. Considerando-se que os voluntários eram alunos do curso de Odontologia, não se realizou a padronização da técnica de escovação.

O uso de dentifrícios durante a escovação pode reduzir a contaminação microbiana de escovas dentais (EFSTRATIOU et al., 2007; LIMA et al., 2007; NELSON-FILHO et al., 2004; QUIRYNEN et al., 2003; VERRAN et al., 1997), pois os mesmos podem conter agentes antimicrobianos como o triclosan (EFSTRATIOU et al., 2007; LIMA et al., 2007; NELSON-FILHO et al., 2004; VERRAN et al., 1997), o flúor (LIMA et al., 2007; NELSON-FILHO et al., 2004; QUIRYNEN et al., 2003) e o citrato de zinco (VERRAN et al., 1997). Devido a esses fatores, a escovação foi realizada sem o uso de dentifrício para evitar interferências na contaminação das escovas dentais por *Candida* spp. e na avaliação da eficácia dos antissépticos bucais utilizados para a desinfecção das escovas.

O tempo de escovação neste estudo foi de dois minutos. O tempo necessário para a contaminação de escovas dentais por microrganismos varia de estudo para estudo, podendo ser de quatro minutos (BARBOZA, 2004; NELSON-FILHO et al., 2004), três minutos (WETZEL et al., 2005), dois minutos (LIMA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008), um minuto (BARBOSA, 2003; MACARI, 2002; NELSON-FILHO et al., 2006; PEREIRA, 2004) ou 30 segundos (WARREN et al., 2001). Optou-se pelo tempo de dois minutos porque este é o tempo normalmente gasto para se efetuar uma escovação de rotina (WATSON et al., 2005).

O Periogard®, um dos antissépticos bucais avaliados, apresenta gluconato de clorexidina a 0,12% como componente ativo. A clorexidina tem sido considerada o agente antimicrobiano mais eficaz contra o biofilme placa dentária e a gengivite (ADAMS; ADDY, 1994). Ela também apresenta atividade contra *Candida* spp. (BAHNA et al., 2007; THÉRAUD et al., 2004) e o seu uso tem sido proposto para o

tratamento e prevenção da candidose bucal em indivíduos infectados com o HIV (BARASCH et al., 2004).

O Neem Sattiva® foi escolhido por ser um antisséptico bucal à base de componentes naturais, como o neem, a própolis, o alcaçuz e os óleos essenciais de eucalipto e menta. O neem apresenta diversas atividades biológicas, inclusive atividade antifúngica (MOSSINI; OLIVEIRA; KEMMELMEIER, 2004; SAIRAM et al., 2000). A própolis apresenta atividade contra *Candida* spp. (BHUSCHI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006). O óleo de eucalipto, por sua vez, é eficaz contra células planctônicas de *C. albicans* e também inibe o crescimento do biofilme dessa levedura (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2008).

Diversos métodos foram propostos para a desinfecção de escovas dentais, tanto métodos físicos como métodos químicos. Entre os físicos, pode-se citar o uso da luz ultravioleta (BERGER; DRUKARTZ; TENENBAUM, 2008; BOYLAN et al., 2008; GLASS; FURGASON; MOODY, 1997) por meio de equipamentos desenvolvidos especificamente para esse fim; o uso do forno de microondas caseiro (CHIBEBE JÚNIOR, 2002); e o uso do calor, introduzindo a escova em água fervente (ZOLNOWSKI-CASEY, 1998). Com relação aos métodos químicos, há trabalhos utilizando álcool (COBB, 1920; SANCHES et al., 2001), solução aquosa saturada de cloreto de sódio e lugol (LEHMER; APPLETON JUNIOR, 1931), solução de ácido bórico a 4,0% e ácido salicílico a 0,2% (FEO, 1981), água eletrolisada (LEE; CHOI, 2006), hipoclorito de sódio a 1,0% (NELSON-FILHO et al., 2000), antissépticos bucais (BARBOSA, 2003; BARBOZA, 2004; CAUDRY; KLITORINOS; CHAN, 1995; MEHTA; SEQUEIRA; BHAT, 2007; NASCIMENTO et al., 2008) e desinfetantes desenvolvidos especificamente para o uso em escovas dentais (MACARI, 2002; NEAL; RIPPIN, 2003; NELSON-FILHO et al., 2006; PEREIRA, 2004).

A desinfecção de escovas dentais pode ser realizada por meio da imersão das mesmas em soluções antimicrobianas (AYŞEGÜI et al., 2007; CAUDRY; KLITORINOS; CHAN, 1995; FEO, 1981; MEHTA; SEQUEIRA; BHAT, 2007; NELSON-FILHO et al., 2000; SANCHES et al., 2001). Entretanto, no presente estudo foram utilizadas soluções antimicrobianas sob a forma de spray, como descrito por alguns autores (AYŞEGÜI et al., 2007; BARBOSA, 2003; BARBOZA, 2004; MACARI, 2002; MEIER et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2008; NEAL; RIPPIN, 2003; NELSON-FILHO et al., 2006; PEREIRA, 2004; SATO et al., 2005).

Essa escolha é justificada por ser um método prático, de aplicação fácil e econômico, evitando desperdício de solução. Além disso, um único frasco pode ser utilizado por vários membros da família. Se houver mais de um banheiro na residência, pode ser colocado um frasco em cada um dos mesmos.

Após a utilização das escovas dentais e a aplicação dos sprays, as mesmas foram mantidas à temperatura ambiente por quatro horas. Esse período foi empregado para simular o intervalo médio entre as escovações. Quando as escovas foram processadas, 37,3% (grupo controle) apresentaram crescimento de *Candida* spp., o que mostra que o período de secagem das cerdas não elimina os microrganismos, sendo necessária a desinfecção das escovas após sua utilização.

A avaliação da contaminação das escovas dentais foi realizada pela técnica da imersão da escova no meio de cultura líquido, com o objetivo de evidenciar a formação do biofilme *in situ*, sobre as cerdas. Essa técnica permite a detecção de um número maior de amostras positivas do que a técnica da dessorção, na qual as escovas são submetidas à agitação mecânica ou ultrassônica para a dessorção dos microrganismos e as suspensões resultantes são diluídas e semeadas em meio de cultura sólido (SATO, 2002).

O Caldo *Letheen* Modificado com 4,0% de glicose foi o meio de cultura escolhido para avaliar o crescimento de *Candida* spp. nas cerdas das escovas dentais. Este meio foi utilizado para neutralizar os agentes antimicrobianos presentes nos antissépticos bucais e permitir a formação do biofilme de espécies de *Candida.* A adição de glicose foi justamente para otimizar a formação de biofilme (HAWSER; DOUGLAS, 1994), pois ela aumenta a atividade metabólica no mesmo (PARAHITIYAWA et al., 2006). A incubação foi a 35°C por 10 dias, como descrito por Sena et al. (2006). A incubação por um período maior permite a obtenção de um biofilme maduro.

O biofilme microbiano nas cerdas das escovas foi raspado com uma alça bacteriológica e semeado por esgotamento em ágar Sabouraud dextrose e CHROMagar™ Candida. Foram utilizados dois meios de cultura para aumentar a probabilidade de isolar *Candida* spp., como sugerido por Silva et al. (2004). O ágar Sabouraud dextrose foi utilizado por ser um meio de cultura não seletivo, empregado para o isolamento de fungos em geral. Além disso, ele é o meio mais utilizado para o isolamento de *Candida* spp. e outras leveduras em amostras clínicas (ODDS, 1991). O CHROMagar™ Candida, por sua vez, é um meio seletivo, o qual inibe o

crescimento bacteriano, pois ele contem cloranfenicol em sua composição. Este meio também é diferencial, o que permite a diferenciação das *Candida* spp. (ODDS; BERNAERTS, 1994). Isso é muito importante quando há cultura mista (cultura polimicrobiana). Neste estudo, por exemplo, foram isoladas duas espécies de *Candida* da escova dental do indivíduo nº 55 após o uso do spray de Neem Sattiva®. As colônias de *C. albicans* apresentavam cor verde, enquanto que as colônias de *Candida* sp. apresentavam cor rosa pálido. Isso não poderia ser visto no ágar Sabouraud dextrose, pois as *Candida* spp. geralmente apresentam cor creme nesse meio.

As leveduras foram identificadas de acordo com a metodologia clássica, como proposto por Sidrim e Rocha (2004), utilizando os seguintes testes: estudo da micromorfologia em ágar fubá com *Tween*-80, formação do tubo germinativo em soro humano, assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, fermentação de carboidratos e crescimento a 37 e 42°C. O último foi realizado para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, a qual foi originalmente descrita por Sullivan et al. (1995) e está associada com a colonização e infecção da cavidade bucal de pacientes com HIV/AIDS (ALVES et al., 2000; SULLIVAN; COLEMAN, 1998).

No teste de crescimento a 37 e 42°C (PINJON et al., 1998), ambas as espécies crescem a 37°C (controle positivo). Entretanto, a maioria dos isolados de *C. dubliniensis* não cresce a 42°C, ao contrário da *C. albicans*, a qual cresce bem nessa temperatura (SULLIVAN; COLEMAN, 1998).

6.1.2 DIMax dos antissépticos

O Periogard® e o Neem Sattiva® foram escolhidos porque eles haviam sido avaliados no estudo clínico randomizado. Portanto, eles também foram avaliados *in vitro*. A solução de gluconato de clorexidina a 0,5% foi escolhida por apresentar uma concentração maior de clorexidina do que o Periogard® (0,12%). Assim, era possível saber se uma concentração maior desse agente apresentaria uma melhor eficácia contra espécies de *Candida*. No trabalho de Shurrab (2006), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do gluconato de clorexidina frente à *C. albicans* ATCC 10231 foi de 0,5%. Portanto, essa concentração foi escolhida para o teste da DIMax.

A técnica da diluição em ágar (WADE; ADDY, 1992) foi escolhida para avaliar a DIMax dos antissépticos. O meio de cultura utilizado foi o ágar Sabouraud dextrose, como descrito por Amorim, Aun e Mayer (2004).

6.1.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais

A formação e a estrutura dos biofilmes de *Candida* spp. são influenciadas pela natureza da superfície de contato (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Portanto, foram avaliados dois tipos de escovas dentais: escovas convencionais de cerdas de náilon e escovas de hastilhas de polietileno de baixa densidade.

As cabeças das escovas foram previamente imersas em água peptonada a 1,0% e secas ao ar livre, com o objetivo de formar uma película adquirida sobre as cerdas e hastilhas. A película adquirida (ou filme condicionante) é importante para o início da formação do biofilme microbiano. No biofilme placa dentária, por exemplo, a película adquirida é formada por constituintes salivares, como a proteína rica em prolina, onde os microrganismos pioneiros se aderem para dar início à formação do biofilme (KOLENBRANDER; LONDON, 1993). O filme condicionante também é formado na superfície de dispositivos médicos devido à adsorção de proteínas do paciente nesta superfície (NETT; ANDES, 2006). Estas proteínas variam de acordo com o local da infecção (NETT; ANDES, 2006) e provavelmente são utilizadas por *Candida* spp. para a aderência e formação do biofilme. Em 1999, Nikawa et al. utilizaram saliva para formar um filme condicionante na superfície de acrílico e facilitar a formação do biofilme de *Candida* spp., com o objetivo de imitar um biofilme formado em uma prótese total. Neste estudo, foi utilizado um filme condicionante constituído de proteína, com o intuito de facilitar a formação do biofilme de *Candida* spp.

As suspensões das leveduras foram preparadas em solução fisiológica a 0,85% esterilizada. A turbidez das suspensões era equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland, de acordo com Sena et al. (2006).

Cada suspensão de levedura foi vertida em uma placa de Petri, onde as cabeças das escovas dentais foram introduzidas. Dentro da placa de Petri, as cerdas e hastilhas das escovas eram raspadas/esfregadas entre si (duas de cada vez). Esse procedimento foi realizado para simular o movimento de escovação

dentária e ele foi realizado durante dois minutos, tempo normalmente gasto para se efetuar uma escovação de rotina (WATSON et al., 2005).

Após o procedimento de contaminação das escovas dentais, elas foram introduzidas em tubos contendo caldo Sabouraud dextrose com 4,0% de sacarose. Esse meio de cultura contem 4,0% de glicose. Além da glicose, 4,0% de sacarose foram adicionados para otimizar a formação de biofilme, pois a adição de sacarose no meio de cultura potencializa mais a atividade metabólica da *C. albicans* no biofilme do que a adição de glicose (PARAHITIYAWA et al., 2006).

Duas condições de incubação foram utilizadas com o objetivo de compará-las: incubação a 35°C sem agitação e incubação à temperatura ambiente sob agitação. Segundo Kojic e Darouiche (2004), a agitação suave aumenta a formação do biofilme por espécies de *Candida*. Portanto, comparou-se a incubação com ou sem agitação para saber se realmente há diferença entre ambas, comparando também as diferenças na temperatura. O tempo de incubação foi de sete dias para a obtenção de um biofilme maduro.

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada no estudo da formação do biofilme do gênero *Candida* (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Neste estudo, essa técnica foi utilizada primeiramente para avaliar se houve a formação de biofilme pelas diferentes espécies de *Candida*. No caso de formação de biofilme, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a estrutura tridimensional dos biofilmes, bem como as formas presentes (leveduras, hifas, pseudohifas), comparando os biofilmes das diferentes espécies de *Candida* avaliadas.

6.2 Resultados

6.2.1 Estudo clínico randomizado

6.2.1.1 Presença de *Candida* spp. nas escovas dentais

Marcano (1981), avaliando a presença de *C. albicans* na boca e nas escovas dentais de 229 pacientes hospitalizados por diferentes causas no Hospital Universitário de Caracas, Venezuela, isolou *C. albicans* da boca de 28,0% dos pacientes e de 18,0% das escovas avaliadas. Essa baixa porcentagem de escovas

contaminadas pode ser devido à metodologia utilizada por Marcano (1981), pois as escovas dos pacientes foram colocadas em meio de cultura líquido e agitadas manualmente para o desprendimento dos microrganismos. Portanto, apenas as células planctônicas são liberadas para o meio de cultura, pois as células sésseis continuam aderidas às cerdas. Essa metodologia permite a obtenção de um número menor de amostras positivas.

Em um estudo piloto, Taji e Rogers (1998) avaliaram a contaminação microbiana de escovas dentais de 10 indivíduos adultos. *Candida* spp. foram isoladas de 70,0% das escovas avaliadas. Esse número foi bastante elevado e pode ser devido ao fato de que os pacientes não eram saudáveis, pois foi observada a presença de lesões de cárie, doença periodontal e/ou anormalidades na mucosa. Além disso, por ser um estudo piloto, o número de indivíduos avaliados foi muito baixo.

Motzfeld et al. (1999) avaliaram a contaminação de escovas dentais de 40 estudantes do primeiro ano da Escola de Odontologia da Universidade do Chile. Apenas 2,8% das escovas avaliadas apresentaram desenvolvimento de *Candida* spp. Essa baixa porcentagem de amostras positivas pode ser explicada pela metodologia utilizada por Motzfeld et al. (1999). Os autores introduziram as escovas dentais em tubos contendo o meio *Thioglycollate* e as incubaram por 24 horas. Após esse período, semearam o caldo nos meios de cultura seletivos. Essa metodologia permite a detecção de um pequeno número de células (leveduras), pois a maioria das *Candida* spp. é capaz de formar biofilme, ou seja, os microrganismos aderem às cerdas das escovas. No caldo são detectadas apenas as células planctônicas.

Em 2004, Barboza avaliou a contaminação de escovas dentais utilizadas por 57 crianças (sete a 10 anos de idade) por leveduras do gênero *Candida*. Apenas 5,3% das amostras apresentaram-se positivas quanto ao crescimento de leveduras. Essa baixa porcentagem pode ser devido à faixa etária dos indivíduos que participaram do estudo, pois a frequência de portadores de *Candida* spp. varia de acordo com a idade do hospedeiro (KLEINEGGER et al., 1996). No estudo de Kleinegger et al. (1996), a *C. albicans* foi isolada da cavidade bucal de 6,0% das crianças de cinco a sete anos de idade.

No presente estudo, as escovas dentais de cinco indivíduos não apresentaram crescimento de *Candida* spp. no grupo controle, mas o microrganismo foi isolado após o uso do spray de Neem Sattiva® (tabela 3). Em um dos casos

(indivíduo nº 8), o microrganismo foi também isolado após o uso do Periogard®. Isso pode ser explicado pela maneira que o indivíduo realizou a escovação no grupo controle. Talvez a escovação não tenha atingido as áreas comumente colonizadas por *Candida* spp. na cavidade bucal, como o dorso da língua, o palato e a mucosa.

Em 1996, Kleinegger et al. demonstraram que a *C. albicans* foi a espécie de *Candida* isolada com maior frequência da cavidade bucal de indivíduos saudáveis de diferentes idades (seis meses a mais de 60 anos), pois esta espécie foi isolada de 69,0% dos indivíduos. A segunda espécie mais isolada foi a *C. parapsilosis* (presente em 10,0% dos indivíduos). A *C. krusei* e a *C. famata* foram isoladas de 4,0% dos indivíduos. A *C. guillermondii* e a *C. zeylanoides* foram isoladas de 3,0% dos indivíduos. Outras três espécies (*C. rugosa*, *C. dubliniensis* e *C. geocandidium*) foram isoladas de apenas 1,0% dos indivíduos.

A *C. albicans* é também a espécie isolada com maior frequência da cavidade bucal de crianças e de adultos com AIDS (BOSCO et al., 2003; MENON et al., 2001), de indivíduos idosos que utilizam prótese dentária total ou parcial (BUDTZ-JÖRGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005) e de pacientes idosos hospitalizados (FANELLO et al., 2006).

A frequência de portadores de *C. albicans* varia de acordo com a idade do hospedeiro. Kleinegger et al. (1996) demonstrou que a *C. albicans* foi isolada da cavidade bucal de 25,0% das crianças de seis meses a um ano e seis meses de idade. Em crianças maiores (cinco a sete anos), esse número foi de apenas 6,0%. Em adolescentes (15 a 18 anos), adultos (30 a 45 anos) e idosos (60 anos ou mais) as frequências de portadores de *C. albicans* foram de 37,0, 39,0 e 45,0%, respectivamente. A frequência de portadores de outras espécies de *Candida* também variou em função da idade do hospedeiro (KLEINEGGER et al., 1996).

A *C. albicans* é a espécie mais comumente associada com a candidose bucal (FOTOS; VINCENT; HELLSTEIN, 1992). Portanto, o controle desse microrganismo é importante para a prevenção da doença, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Em pacientes infectados com o HIV, por exemplo, a candidose bucal ocorre em alta prevalência (SAMARANAYAKE; HOLMSTRUP, 1989).

6.2.1.2 Desinfecção das escovas dentais com Periogard®

A clorexidina tem sido utilizada em diferentes formulações, como antissépticos bucais, géis, dentifrícios, chicletes, sprays e outros (HERRERA et al., 2003) devido à sua eficácia como um agente antimicrobiano.

Vários pesquisadores têm reportado a atividade da clorexidina contra células planctônicas de *Candida* spp. (AMORIM; AUN; MAYER, 2004; BAHNA et al., 2007; DAROUICHE; MANSOURI; KOJIC, 2006; RUFF; MCCLANAHAN; BABEL, 2006; SHURRAB, 2006; THÉRAUD et al., 2004; VIANNA et al., 2004) e contra *C. albicans* no biofilme (BAHNA et al., 2007; LAFLEUR; KUMAMOTO; LEWIS, 2006; LAMFON et al., 2004; SENA et al., 2006; THÉRAUD et al., 2004).

Também foi demonstrado que a clorexidina nas concentrações de 0,1 e 0,2% (normalmente utilizadas em antissépticos bucais) inibe a aderência de *C. albicans* às células epiteliais da boca (AUDUS et al., 1992; DARWAZEH et al., 1994; PIZZO et al., 2001), o que é vantajoso para o paciente, pois a aderência é um fator importante para que ocorra a infecção.

Devido à sua segurança e eficácia, tem sido proposto o uso de antissépticos bucais contendo clorexidina no tratamento e prevenção de candidose bucal em crianças infectadas com o HIV (BARASCH et al., 2004).

A desinfecção de escovas dentais com antissépticos bucais à base de clorexidina tem sido proposta por alguns autores para inibir a formação do biofilme cariogênico nas cerdas das escovas (BARBOSA, 2003; BARBOZA, 2004; NASCIMENTO et al., 2008; NELSON-FILHO et al., 2006). Além do biofilme cariogênico, vários microrganismos podem ser reduzidos/eliminados das escovas dentais após a sua desinfecção com clorexidina, como estreptococos e bacilos Gram-negativos (BARBOZA, 2004; SATO et al., 2005).

Avaliando escovas dentais utilizadas por 57 crianças (sete a 10 anos de idade), Barboza (2004) demonstrou que três (5,2%) escovas dentais estavam contaminadas com leveduras do gênero *Candida*. Com o uso do spray de Periogard® (cinco borrifos em cada escova), esse número foi reduzido para um (33,3%), ou seja, o Periogard® eliminou *Candida* spp. de 66,7% das escovas, o que é relevante, pois crianças apresentam um risco maior à candidose bucal.

6.2.1.3 Desinfecção das escovas dentais com Neem Sattiva®

O neem (*Azadirachta indica*) é muito utilizado na Índia e no sul da Ásia para a manutenção da saúde bucal (PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004). É muito comum nessas regiões a escovação com ramos da árvore e a mastigação das folhas e sementes após as refeições (PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004).

Atualmente, encontram-se disponíveis no comércio diversas formulações à base de neem que são utilizadas no tratamento de várias doenças (BRAHMACHARI, 2004). Portanto, vários estudos clínicos e farmacológicos são realizados com o intuito de avaliar não somente as formulações comerciais, mas também as diferentes partes da árvore, com resultados sempre satisfatórios (BRAHMACHARI, 2004).

Em um estudo clínico realizado por Pai, Acharya e Udupa (2004), foi demonstrado que um gel à base de extrato de folhas de neem (25,0mg/g) foi mais eficaz em reduzir o índice de biofilme placa dental do que um antisséptico bucal à base de gluconato de clorexidina (0,2%). A eficácia do gel à base de neem pode ser devido à liberação lenta da droga através da matriz viscosa do gel, mantendo a concentração da droga bem acima da concentração terapêutica (PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004).

A atividade antifúngica do neem tem sido demonstrada por alguns autores. Mossini, Oliveira e Kemmelmeier (2004) demonstraram que o extrato aquoso de folhas de neem (concentrações maiores que 50,0mg/ml) apresenta atividade antifúngica contra o *Penicillium expansum*, devido à presença de compostos altamente bioativos que podem alterar o metabolismo secundário do fungo.

Em 2000, SaiRam et al. avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de neem e do NIM-76. O óleo de neem é um extrato das sementes do neem, o qual é muito utilizado na medicina tradicional da Índia para o tratamento de várias doenças (UPADHYAY et al., 1992). O NIM-76, por sua vez, é uma fração do óleo de neem que foi desenvolvida para o uso pré-coital devido à sua ação espermicida (SAIRAM et al., 2000). Avaliando a atividade antifúngica de ambos os produtos contra *C. albicans*, SaiRam et al. (2000) demonstraram que a CIM do NIM-76 e do óleo de neem foi de 0,25mg/ml e 1,2mg/ml, respectivamente. Portanto, o NIM-76 foi o mais eficaz.

SaiRam et al. (2000) também avaliaram a atividade antifúngica *in vivo* do NIM-76 comparado com o cetoconazol (utilizado como controle positivo), ambos

administrados oralmente em camundongos na dose de 60mg/kg. O NIM-76 foi capaz de controlar a candidose sistêmica, o que foi revelado pela baixa porcentagem de mortalidade dos animais tratados (30,0% para o NIM-76 e 40,0% para o cetoconazol) comparado com o grupo controle, o qual apresentou 60,0% de mortalidade. Portanto, o NIM-76 foi mais eficaz *in vivo* do que o cetoconazol. O NIM-76 também reduziu significantemente o crescimento de *C. albicans* de vários tecidos, quando comparado com o grupo não tratado. Concluíram que a atividade antimicrobiana do NIM-76 o torna um anticoncepcional vaginal altamente desejável, pois além da sua atividade espermicida, ele mantém a saúde da vagina, pois previne o crescimento de *C. albicans*, uma das causas mais comuns de vaginite.

Resultados insatisfatórios foram apresentados por Polaquini et al. (2006), que avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de neem frente a duas cepas de *C. albicans* (sorotipos 12A e 156B). No teste da CIM, ambas as cepas não foram inibidas pelo extrato de neem até a concentração 0,1g/ml.

Outros resultados insatisfatórios também foram demonstrados por Agarwal, Lal e Pruthi (2008), que avaliaram o efeito do óleo de neem sobre duas cepas de *C. albicans* (um isolado clínico e uma cepa padrão MTCC 227). No método de difusão-de-disco, os diâmetros das zonas de inibição foram de “0”mm.

Além da tintura de neem, o Neem Sattiva® contêm tintura de própolis (2,0%), extrato de alcaçuz (2,0%), óleo de eucalipto (0,10%) e óleo de menta (0,10%) como componentes ativos (Tabela 1).

A própolis é uma resina coletada de brotos de árvores pelas abelhas *Apis mellifera* e misturada com cera secretada por estas abelhas (KOO et al., 2000). Assim como o neem, a própolis é muito utilizada na medicina popular devido às suas diversas atividades biológicas. Entretanto, é a atividade antimicrobiana da própolis que tem aumentado o interesse por esta resina (KOO et al., 2000). Foi demonstrado que o extrato etanólico de própolis inibe a formação do biofilme placa dentária *in vitro* (KOO et al., 2000), além de apresentar atividade antimicrobiana significante contra microrganismos cariogênicos (BRUSCHI et al., 2006; KOO et al., 2000) e periodontopatogênicos (KOO et al., 2000).

O extrato etanólico de própolis também apresenta atividade contra *Candida* spp., não apenas contra cepas padrão, como a *C. albicans* ATCC 28366 (BRUSCHI et al., 2006), mas também contra diferentes espécies de *Candida* isoladas de pacientes (OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, no estudo de Koo et al. (2000), as

cepas de *C. albicans* avaliadas (*C. albicans* NTCC 3736 e *C. albicans* F12, isolada de triagem clínica) apresentaram zonas de inibição muito pequenas (0,83mm) quando avaliadas com o extrato etanólico de própolis. É interessante citar que nos trabalhos de Bruschi et al. (2006) e Oliveira et al. (2006), nos quais houve atividade antimicrobiana, a procedência da própolis era a mesma (apiário da fazenda da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná). No trabalho de Koo et al. (2000) não houve atividade antimicrobiana e a própolis era de outro local (estado de Minas Gerais). Portanto, a procedência da própolis influencia na atividade antimicrobiana da mesma.

É muito comum o uso de óleos essenciais em antissépticos bucais. O Neem Sattiva® apresenta dois óleos essenciais diferentes em sua composição: o óleo de menta e o óleo de eucalipto.

Em 2008, Agarwal, Lal e Pruthi demonstraram que o óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) apresentou atividade contra duas cepas de *C. albicans* (um isolado clínico e uma cepa padrão MTCC 227). Eles utilizaram o método de difusão-de-disco, no qual discos de 5,0mm de diâmetro haviam sido embebidos em 5,0µl do óleo essencial. A média dos diâmetros das zonas de inibição do óleo de eucalipto foi de 26,7mm para o isolado clínico e 27,2mm para a cepa padrão. Ainda avaliaram o efeito inibitório deste óleo no crescimento do biofilme de *C. albicans* (isolado clínico). O óleo de eucalipto a 0,84% reduziu em 80,87% a formação do biofilme. A CIM do óleo de eucalipto foi de 0,05%. Esse valor foi menor do que a concentração de óleo de eucalipto presente no Neem Sattiva® (0,10%).

No estudo de Hammer, Carson e Riley (1998) a CIM do óleo de eucalipto (*Eucalyptus fruticetorum*) foi determinada contra a *C. albicans* ATCC10231 utilizando o método da diluição em ágar e o seu valor foi de 1,0%, ou seja, uma concentração bem maior do que a presente no Neem Sattiva®.

Nos trabalhos de Agarwal, Lal e Pruthi (2008) e Hammer, Carson e Riley (1998) os resultados foram bastante diferentes, provavelmente devido ao fato de avaliarem diferentes espécies de eucalipto: *E. globulus* e *E. fruticetorum*, respectivamente.

Apesar do Neem Sattiva® apresentar uma associação de componentes ativos, a sua eficácia foi baixa. Esse antisséptico bucal contém tintura de neem a 1,0% em sua formulação. Entretanto, não se sabe de qual parte da árvore foi obtida a tintura de neem, pois essa informação não se apresenta no rótulo do produto. Talvez a

atividade deste antisséptico contra *Candida* spp. seja aumentada com a adição de óleo de neem, pois foi demonstrada a atividade deste óleo, principalmente da fração NIM-76, contra *C. albicans* (SAIRAM et al., 2000).

6.2.2 DIMax dos antissépticos

A concentração de clorexidina necessária para inibir *Candida* spp. é muito maior do que a necessária para inibir o crescimento bacteriano (HIOM et al., 1992).

Giuliana et al. (1997) avaliaram a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de três antissépticos bucais contendo digluconato de clorexidina frente a algumas *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes transplantados, os quais apresentavam candidose bucal. Dois antissépticos (Corsodyl e Dentosan) apresentavam 0,2% de clorexidina. A CFM destes antissépticos contra *C. albicans* foi de 31,25µg/ml (diluição 1/64). Com relação à *C. parapsilosis*, a CFM foi de 62,5µg/ml (diluição 1/32) para o Corsodyl e de 250,0µg/ml (diluição 1/8) para o Dentosan. O outro antisséptico avaliado foi o Plak out, o qual contem 0,12% de clorexidina. A CFM deste antisséptico frente à *C. albicans* foi de 37,5µg/ml (diluição 1/32). Com relação à *C. parapsilosis*, o valor foi de 150,0µg/ml (diluição 1/8). No presente estudo, foi avaliado o Periogard®, o qual contem 0,12% de clorexidina, assim como o Plak out que foi avaliado no estudo de Giuliana et al. (1997). Os resultados de ambos os antissépticos frente à *C. albicans* foram semelhantes, pois a DIMax do Periogard® foi de 1/20 no presente estudo. Entretanto, para a *C. parapsilosis* os resultados foram muito diferentes, pois a DIMax do Periogard® foi de 1/20.

No trabalho de Amorim, Aun e Mayer (2004), a CIM do digluconato de clorexidina contra *C. albicans* (isolados clínicos) foi de 4,0µg/ml, a qual foi determinada utilizando o método da diluição em ágar.

Em 2000, SaiRam et al. avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de neem e do NIM-76 contra *C. albicans* e demonstraram que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do NIM-76 e do óleo de neem foi de 0,25mg/ml e 1,2mg/ml, respectivamente. Portanto, o NIM-76 foi o mais eficaz.

Resultados insatisfatórios foram apresentados por Polaquini et al. (2006), que avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de neem frente a

duas cepas de *C. albicans* (sorotipos 12A e 156B). No teste da CIM, ambas as cepas não foram inibidas pelo extrato de neem até a concentração 0,1g/ml.

Apesar de existirem alguns trabalhos avaliando a atividade antifúngica do neem, é necessário que estudos adicionais sejam realizados para avaliar as diferentes partes da árvore (folhas, flores, raízes, sementes e casca) e também as diferentes formulações comerciais, como antissépticos bucais e dentifrícios.

O uso alternativo de produtos ecologicamente seguros deve ser encorajado. Os compostos do neem, por exemplo, não persistem no meio ambiente e são degradados pela chuva e pelos raios ultravioletas (BRAHMACHARI, 2004).

6.2.3 Formação de biofilme, *in vitro*, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais

Há diversos fatores que influenciam na formação e na estrutura dos biofilmes de *Candida* spp., como a natureza da superfície de contato (KOJIC; DAROUICHE, 2004; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Neste estudo, isso ficou bastante evidente quando as *Candida* spp. formaram biofilme no polietileno de baixa densidade das hastilhas e não foram capazes de formar biofilme no náilon das cerdas. Alguns materiais podem sustentar o crescimento de um biofilme espesso, o que não ocorre com outros materiais (HAWSER; DOUGLAS, 1994). A topografia da superfície é um fator importante: quanto mais lisa a superfície, menor será a formação de biofilme (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). A superfície do náilon, por exemplo, é bastante lisa. Por outro lado, a superfície das hastilhas é extremamente irregular, o que provavelmente contribuiu para a formação do biofilme.

As espécies de *Candida* diferem na sua habilidade de formar biofilme. De maneira geral, os biofilmes das diferentes espécies variam na morfologia, na composição das substâncias poliméricas extracelulares (matriz) e na resistência a antifúngicos (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008).

Em 2001, Chandra et al. avaliaram a formação do biofilme de *C. albicans*, *in vitro*, no polimetilmetacrilato (material de prótese total) e no elastômero de silicone (material de cateter). O polimetilmetacrilato apresenta superfície irregular, enquanto que o elastômero de silicone apresenta superfície plana. O biofilme formado no polimetilmetacrilato era constituído principalmente de células leveduriformes embutidas na matriz de polímeros extracelulares. No elastômero de silicone houve a

formação de um biofilme mais espesso, constituído de células leveduriformes, hifas e pseudohifas embutidas na matriz. Esses resultados mostram que a mesma cepa pode produzir biofilmes morfologicamente distintos sobre diferentes substratos.

Hawser e Douglas (1994) demonstraram, *in vitro*, que nos cateteres urinários de látex ou de elastômero de silicone houve a formação de um biofilme de *C. albicans* mais espesso do que nos cateteres de 100,0% de silicone. Com relação ao cateter venoso central, o de cloreto de polivinil (PVC) foi mais suscetível à formação de biofilme do que o de poliuretano. No cateter de PVC, a microscopia eletrônica de varredura mostrou um biofilme maduro, constituído de células leveduriformes, hifas e pseudohifas embutidas na matriz de polímeros extracelulares. Também compararam os biofilmes de diferentes espécies de *Candida* formados em cateteres de PVC e demonstraram que isolados de *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* e *C. glabrata* formaram biofilme mais delgado do que a *C. albicans*. Entretanto, uma cepa de *C. parapsilosis* (AAHB 4479) formou um biofilme mais espesso do que a outra cepa avaliada (cepa Glasgow). A *C. krusei*, por sua vez, formou um biofilme mais espesso do que a *C. albicans*.

Em 2002, Kuhn et al. compararam os biofilmes formados, *in vitro*, por algumas *Candida* spp. sobre o elastômero de silicone. As cepas invasivas de *C. albicans* (isoladas do sangue e de cateteres) formaram um biofilme mais espesso do que as comensais (isoladas da vagina, pele, etc.). Com relação às diferentes espécies avaliadas, a *C. albicans* formou um biofilme mais espesso do que a *C. parapsilosis*, a *C. glabrata* e a *C. tropicalis*. O biofilme de *C. albicans* era formado de células leveduriformes embutidas em uma matriz espessa na camada aderida à superfície, e de hifas na camada externa. A *C. parapsilosis* formou um biofilme mais delgado composto apenas de células leveduriformes aderidas à superfície e com pouca matriz de polímeros extracelulares. Com relação à *C. glabrata*, a microscopia mostrou apenas algumas células leveduriformes aderidas à superfície do substrato. O biofilme da *C. tropicalis* era semelhante ao da *C. parapsilosis*, com exceção de uma cepa que formou um biofilme constituído apenas de uma camada delgada de hifas embutidas na matriz.

Em 2006, Parahitiyawa et al. demonstraram, *in vitro*, algumas diferenças entre os biofilmes formados por *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* no CBD, um sistema de poliestireno para formação de biofilme. A *C. krusei* formou o biofilme mais espesso, constituído de várias camadas de pseudohifas

embutidas na matriz de polímeros extracelulares. Os biofilmes da *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* apresentavam grupos de células leveduriformes embutidas na matriz. A *C. glabrata* formou um biofilme constituído de cadeias de células com vários blastoconídios embutidos na matriz.

A formação de biofilme é o maior fator de virulência do gênero *Candida* (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Portanto, é necessária a realização de estudos adicionais (*in vitro* e *in vivo*) para avaliar a formação e a estrutura dos biofilmes de diferentes espécies de *Candida* sobre diversos substratos, principalmente aqueles onde as *Candida* spp. usualmente formam biofilme, como dispositivos médicos e escovas dentais. É também necessário avaliar a atividade antifúngica de diferentes agentes antimicrobianos sobre os biofilmes.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Candida* sp.) foram isoladas de escovas dentais utilizadas por estudantes universitários;
- o spray de Periogard® foi mais eficaz que o spray de Neem Sattiva® em eliminar o crescimento de *Candida* spp. nas escovas dentais utilizadas por estudantes universitários;
- as DIMaxs, *in vitro*, do Neem Sattiva®, do Periogard® e da solução de gluconato de clorexidina a 0,5% frente a 63 cepas de *Candida* spp. foram 1/10, 1/20 e 1/40, respectivamente;
- *Candida* spp. foram capazes de formar biofilme, *in vitro*, sobre hastilhas (polietileno de baixa densidade) de escovas dentais. O mesmo não ocorreu nas cerdas de náilon.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, D.; ADDY, M. Mouthrinses. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 8, n. 2, p. 291-301, Jul. 1994.

AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 165, n. 1, p. 13-9, Jan. 2008.

ALVES, S. H.; SILVA, G. M.; SCOPEL, P. A.; OLIVEIRA, L. T. O.; COSTA, J. M.; MILÁN, E. P.; COLOMBO, A. L. Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v. 44, n. 3, 4, p. 185-7, jul.-dez. 2000.

AMORIM, C. V. G.; AUN, C. E.; MAYER, M. P. A. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. **Braz. Oral Res.**, v. 18, n. 3, p. 242-6, 2004.

AUDUS, K. L.; TAVAKOLI-SABERI, M. R.; ZHENG, H.; BOYCE, E. N. Chlorhexidine effects on membrane lipid domains of human buccal epithelial cells. **J. Dent. Res.**, New York, v. 71, n. 6, p. 1298-303, Jun. 1992.

AYŞEGÜI, Ö.; ELGIN, I. E.; GULCIN, A.; NEDIM, S. The efficacy of chlorhexidine spray vs mouthwash in the microbial contamination of child toothbrushes. **J. Dent. Child. (Chic.)**, v. 74, n. 3, p. 177-81, Sep.-Dec. 2007.

BAHNA, P.; HANNA, H. A.; 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 Oncology**, v. 43, p. 159-64, 2007.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 7, p. 671-9, Jul. 1999.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antim. Chemo.**, v. 46, p. 397-403, 2000.

BARASCH, A.; SAFFORD, M. M.; DAPKUTE-MARCUS, I.; FINE, D. H. Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children: a pilot study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n. 2, p. 204-7, Feb. 2004.

BARBOSA, B. M. C. **Avaliação da contaminação microbiana e eficácia de agentes antimicrobianos na desinfecção de escovas dentais de pacientes portadores de necessidades especiais**. 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BARBOZA, D. B. D. **Avaliação da contaminação de escovas dentais de crianças e do efeito do spray de clorexidina como método de desinfecção.** 2004. 168 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Odontopediatria) – Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, Campinas, 2004.

BERGER, J. R.; DRUKARTZ, M. J.; TENENBAUM, M. D. The efficacy of two UV toothbrush sanitization devices. A pilot study. **N. Y. State Dent. J.**, v. 74, n. 1, p. 50-2, Jan. 2008.

BLIGNAUT, E. Oral candidiasis and oral yeast carriage among institutionalised South African paediatric HIV/AIDS patients. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 163, p. 67-73, 2007.

BOBICHON, H.; BOUCHET, P. Action of chlorhexidine on budding *Candida albicans*: Scanning and transmission electron microscopic study. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 100, n. 1, p. 27-35, Oct. 1987.

BORGES, E. J. S.; YOXINO, J.; MIRANDA, A. V.; CORREA, L. R.; SILVEIRA, S. R. A.; SIQUEIRA, R. V.; CHAVASCO, J. K. Verificação da contaminação de escovas de dente por coliformes e parasitas intestinais. **Rev. Univ. Alfenas**, Alfenas, v. 2, p.183-7, 1996.

BOSCO, V. L.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E.; PAULA, C. R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 3, p. 217-22, 2003.

BOYLAN, R.; LI, Y.; SIMEONOVA, L.; SHERWIN, G.; KREISMANN, J.; CRAIG, R. G.; SHIP, J. A.; MCCUTCHEON, J. A. Reduction in bacterial contamination of toothbrushes using in the Violight ultraviolet light activated toothbrush sanitizer. **Am. J. Dent.**, v. 21, n. 5, p. 313-7, Oct. 2008.

BRAHMACHARI, G. Neem – an omnipotent plant: a retrospection. **Chembiochem.**, v. 5, p. 408-21, 2004.

BRUSCHI, M. L.; LARA, E. H. G.; MARTINS, C. H. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 32, n. 2, p. 229-38, Feb. 2006.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 61-9, Feb. 1990.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; STENDERUP, A.; GRABOWSKI, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 3, n. 3, p. 115-9, May 1975.

BUNETEL, L.; TRICOT-DOLEUX, S.; AGNANI, G.; BONNAURE-MALLET, M. *In vitro* evaluation of the retention of three species of pathogenic microorganisms by three different types of toothbrush. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 15, n. 5, p.313-6, Oct. 2000.

CARVAJAL, E.; GÁLVEZ, P.; MAJLIS, G.; OYARZÚN, A. Presencia de microorganismos en cepillos dentales utilizados en higiene oral habitual. **Rev. Dent. Chile**, Santiago, v. 86, n. 1, p. 25-8, abr. 1995.

CAUDRY, S. D.; KLITORINOS, A.; CHAN, E. C. S. Contaminated toothbrushes and their disinfection. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 61, n. 6, p. 511-6, Jun. 1995.

CESCO, R. T.; BIGNELLI, P.; SANTOS, C. P.; ITO, I. Y. Toothbrushes: evaluation of contamination level by streptococci of mutans group. In: WORLD CONGRESS ON PREVENTIVE DENTISTRY, 5., 1995, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1995. p. 1003.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep. 2001.

CHIBEBE JÚNIOR, J. Avaliação da esterilização de escovas dentais em forno de microondas (estudo *in vitro*). **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 16, p. 182, 2002.

COBB, C. M. The tooth brush as a cause of repeated infections of the mouth. **Boston Med. Surg. J.**, v. 183, n. 9, p. 263-4, Aug. 1920.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. Exoenzyme secretion by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates from whole saliva of oral lesion patients. **RBCF**, São Paulo, v. 41, supl. 1, p. 273, set. 2005.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 167, n. 2, p. 73-9, 2009.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5417, p. 1318-22, May 1999.

DAROUICHE, R. O.; MANSOURI, M. D.; KOJIC, E. M. Antifungal activity of antimicrobial-impregnated devices. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, n. 4, p. 397-9, April 2006.

DARWAZEH, A. M. G.; LAMEY, P. J.; MACFARLANE, T. W.; MCCUISH, A. C. The effect of exposure to chlorhexidine gluconate *in vitro* and *in vivo* on *in vitro* adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetic and nondiabetic subjects. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 23, n. 3, p. 130-2, Mar. 1994.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr. 2002.

EFSTRATIOU, M.; PAPAIOANNOU, W.; NAKOU, M.; KTENAS, E.; VROTSOS, I. A.; PANIS, V. Contamination of a toothbrush with antibacterial properties by oral microorganisms. **J. Dent.**, v. 35, n. 4, p. 331-7, Apr. 2007.

FANELLO, S.; BOUCHARA, J. P.; SAUTERON, M.; DELBOS, V.; PAROT, E.; MAROT-LEBLOND, A.; MOALIC, E.; LE FLOHICC, A. M.; BRANGERD, B. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 223-8, 2006.

FEO, M. Supervivencia y desinfección de *Candida albicans* en el cepillo de dientes. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 74, n. 3, p. 129-34, Jun. 1981.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. R. **Epidemiologia clínica**: bases científicas da conduta médica. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989. 312 p.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. R. **Epidemiologia clínica**: elementos essenciais. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FOTOS, P. G.; VINCENT, S. D.; HELLSTEIN, J. W. Oral Candidosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 74, n. 1, p. 41-9, Jul. 1992.

GIULIANA, G.; PIZZO, G.; MILICI, M. E.; MUSOTTO, G. C.; GIANGRECO, R. *In vitro* antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 8, p. 729-33, Aug. 1997.

GLASS, R. T.; FURGASON, M.; MOODY, J. *In vivo* study of the efficacy of an ultra-violet toothbrush sanitizer. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 76, p. 385, 1997. Special Issue.

GLASS, R. T.; LARE, M. M. Toothbrush contamination: a potential health risk? **Quintessence Int.**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 39-42, Jan. 1986.

GLASS, R. T.; MARTIN, M. E.; PETERS, L. J. Transmission of disease in dogs by toothbrushing. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 20, n. 11, p. 819-24, 1989.

GRIGOLETTO, J. C.; GASPAR, D.; WATANABE, M. G. C.; MESTRINER JÚNIOR, W.; BREGAGNOLO, J. C. Hábitos de higiene bucal e utilização de uma mesma escova dental por mais de um membro da mesma família no município de Guatapará-SP. In: CONGRESSO UNIVERSITÁRIO ODONTOLÓGICO DE RIBEIRÃO PRETO, 4., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: USP, 2001. p.76.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *In-vitro* activity of essentials oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 5, p. 591-5, Nov. 1998.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 3, p. 915-21, Mar. 1994.

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.**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 307-14, Apr. 2003.

HIOM, S. J.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. Uptake of ^{14}C-chlorhexidine gluconate by *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 20-22, Jul. 1995.

HIOM, S. J.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D.; DICKINSON, J. R. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 72, n. 4, p. 335-40, Apr. 1992.

HIOM, S. J.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D.; DICKINSON, J. R. Effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbios**, v. 74, n. 299, p. 111-20, 1993.

JACOBSEN, P. L.; EPSTEIN, J. B.; COHAN, R. P. Understanding “alternative”dental products. **Gen. Dent.**, v. 49, n. 6, p. 616-620, Nov.-Dec. 2001.

KENNEDY, H. F.; MORRISON, D.; TOMLINSON, D.; GIBSON, B. E. S.; BAGG, J.; GEMMELL, C. G. Gingivitis and toothbrushes: potential roles in viridans streptococcal bacteraemia. **J. Infect.**, v. 46, n. 1, p. 67-70, Jan. 2003.

KLEINEGGER, C. L.; LOCKHART, S. R.; VARGAS, K.; SOLL, D. R. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2246-54, Sep. 1996.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 2, p. 255-67, Apr. 2004.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, n. 11, p. 3247-52, Jun. 1993.

KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch. Oral Biol.**, v. 45, p. 141-8, 2000.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 878-88, Feb, 2002.

KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 608-11, Dec. 2002.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 11, p. 3839-46, Nov. 2006.

LAMFON, H.; PORTER, S. R.; MCCULLOUGH, M.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, p. 383-5, 2004.

LEE, S.; CHOI, B. Antibacterial effect of electrolyzed water on oral bacteria. **J. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 417-22, Aug. 2006.

LEHMER, E.; APPLETON JUNIOR, J. L. T. Care of the toothbrush. **J. Dent. Res.**, New York, v. 11, n. 3, p. 530, Jun. 1931.

LIMA, M. V.; WATANABE, E.; FARIA, G.; NASCIMENTO, A. P.; VERRI, M. P.; ITO, I. Y. Biofilme: avaliação do nível de contaminação de escovas dentais Monobloc® em função do dentifrício. **Rev. Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 22, n. 57, p. 269-74, jul./set. 2007.

LOCK, G.; DIRSCHERL, M.; OBERMEIER, F.; GELBMANN, C. M.; HELLERBRAND, C.; KNÖLL, A.; SCHÖLMERICH, J.; JILG, W. Hepatitis C – contamination of toothbrushes: myth or reality? **J. Viral Hepat.**, v. 13, n. 9, p. 571-3, Sep. 2006.

MACARI, S. **Eficácia de soluções antimicrobianas, na forma de spray, para a desinfecção de escovas dentais de crianças.** 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

MAIA CAMPOS, G. **Software GMC**, versão 2002. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html#gmc>. Acesso em: 12 jan. 2009.

MALMBERG, E.; BIRKHED, D.; NORVENIUS, G.; NORÉN, J. G.; DAHLÉN, G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 52, n. 2, p. 93-8, Apr. 1994.

MARCANO, C. El cepillo de dientes en la ecologia de *Candida albicans*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 135-41, jun. 1981.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral**. 4 ed. São Paulo: Santos, 2005. 192p.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 147-79, Jan. 1999.

MEHTA, A.; SEQUEIRA, P. S.; BHAT, G. Bacterial contamination and decontamination of toothbrushes after use. **N. Y. State Dent. J.**, v. 73, n. 3, p. 20-2, April 2007.

MEIER, S.; COLLIER, C.; SCALETTA, M. G.; STEPHENS, J.; KIMBROUGH, R.; KETTERING, J. D. An *in vitro* investigation of the efficacy of CPC for use in toothbrush decontamination. **J. Dent. Hyg.**, Chicago, v. 70, n. 4, p. 161-5, Jul.-Aug. 1996.

MENON, T.; UMAMAHESWARI, K.; KUMARASAMY, N.; SOLOMON, S.; THYAGARAJAN, S. P. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. **Acta Tropica**, v. 80, p. 151-4, 2001.

MOSSINI, S. A. G.; OLIVEIRA, K. P.; KEMMELMEIER, C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* culture with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. **J. Basic Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 106-13, 2004.

MOTZFELD, R.; HUERTA, J.; APIP, A.; ARAYA, E.; MELLER, C. Tipo y grado de contaminación por bacterias bucales y levaduras, de cepillos dentales con uso habitual. **Rev. Fac. Odontol. Univ. de Chile**, Santiago, v. 17, n. 1, p. 9-14, ene./jun. 1999.

MÜLLER, H.-P.; LANGE, D. E.; MÜLLER, R. F. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contamination of toothbrushes from patients harbouring the organism. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 16, n. 6, p. 388-90, Jul. 1989.

NASCIMENTO, A. P.; FARIA, G.; WATANABE, E.; ITO, I. Y. Efficacy of mouthrinse spray in inhibiting cariogenic biofilm formation on toothbrush bristles. **Braz. J. Oral Sci.**, Piracicaba, v. 7, n. 24, p. 1489-92, Jan./Mar. 2008.

NEAL, P. R.; RIPPIN, J. W. The efficacy of a toothbrush disinfectant spray – an *in vitro* study. **J. Dent.**, v. 31, n. 2, p. 153-7, Feb. 2003.

NELSON-FILHO, P.; FARIA, G.; SILVA, R. A.; ROSSI, M. A.; ITO, I. Y. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48-month-old children. **J. Dent. Child.**, v.73, n. 3, p. 152-8, Sep./Dec. 2006.

NELSON-FILHO, P.; ISPER, A. R.; ASSED, S.; FARIA, G.; ITO, I. Y. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v. 26, n. 1, p. 11-6, Jan./Feb. 2004.

NELSON-FILHO, P.; MACARI, S.; FARIA, G.; ASSED, S.; ITO, I. Y. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.22, n. 5, p. 381-4, Sep./Oct. 2000.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 1-6, 2006.

NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. **Mycoses**, v. 42, n. 1-2, p. 37-40, Apr. 1999.

ODDS, F. C. Sabouraud (‘s) agar. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, n. 6, p. 355-9, 1991.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 8, p. 1923-9, Aug. 1994.

OLIVEIRA, A. C. P.; SHINOBU, C. S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 493-7, Aug. 2006.

OMAR, S.; ZHANG, J.; MACKINNON, S.; LEAMAN, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J.; ARNASON, J. T.; SANCHEZ-VINDAS, P. E.; POVEDA, L.; TAMEZ, P. A.; PEZZUTO, J. M. Traditionally-used antimalarials from the Meliaceae. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, n. 2, p. 133-9, 2003.

PAI, M. R.; ACHARYA, L. D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel - a 6-week clinical study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p.99-103, 2004.

PARAHITIYAWA, N. B.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P.; YE, J.; TSANG, P. W. K.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, S. K. W. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. **APMIS**, v. 114, n. 4, p. 298-306, Apr. 2006.

PARIDA, M. M.; UPADHYAY, C.; PANDYA, G.; JANA, A. M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 273-8, 2002.

PEREIRA, M. S. S. **Avaliação da contaminação de escovas dentais de crianças em idade pré-escolar, em função do uso de diferentes soluções antimicrobianas:** estudo clínico randomizado (cultura microbiana e MEV). 2004. 98 f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 7, p. 2093-5, Jul. 1998.

PIZZO, G.; GIULIANA, G.; MILICI, M. E.; D'ANGELO, M. Effect of antimicrobial mouthrinses on the *in vitro* adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Clin. Oral Investig.**, v. 5, n. 3, p. 172-6, Sep. 2001.

POLAQUINI, S. R. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 51, p. 482-490, 2006.

QUIRYNEN, M.; DE SOETE, M.; PAUWELS, M.; GIZANI, S.; VAN MEERBEEK, B.; VAN STEENBERGHE, D. Can toothpaste or a toothbrush with antibacterial tufts prevent toothbrush contamination? **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, n. 3, p. 312-22, Mar. 2003.

RUFF, M. L.; MCCLANAHAN, S. B.; BABEL, B. S. *In vitro* antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. **J. Endod.**, v. 32, p. 331-3, 2006.

SAIRAM, M.; ILAVAZHAGAN, G.; SHARMA, S. K.; DHANRAJ, S. A.; SURESH, B.; PARIDA, M. M.; JANA, A. M.; DEVENDRA, K.; SELVAMURTHY, W. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss). **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, n. 3, p. 377-382, Aug. 2000.

SAMARANAYAKE, L. P.; HOLMSTRUP, P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 18, n. 10, p. 554-64, Dec. 1989.

SANCHES, M. H.; PERES, S. H. C. S.; PERES, A. S.; BASTOS, J. R. M. Descontaminação das escovas dentais por imersão em soluções anti-sépticas. **RGO**, Porto Alegre, v. 49, n. 3, p. 167-71, jul./set. 2001.

SATO, S. **Avaliação *in vivo* da eficácia de soluções antimicrobianas sob a forma de spray para a desinfecção de escovas dentais.** 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SATO, S.; PEDRAZZI, V.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. F.; ITO, I. Y. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an *in vivo* evaluation. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 36, n. 10, p. 812-6, Nov./Dec. 2005.

SENA, N. T.; GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. **Int. Endod. J.**, v. 39, p. 878-85, 2006.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis.**, v. 14, n. 7, p. 582-90, Oct. 2008.

SENEVIRATNE, C. J.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Distribution coefficients of dietary sugars in artificial *Candida* biofilms. **Mycopathologia**, Netherlands, Feb. 2009.

SHIN, J. H.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; KIM, S. H.; SHIN, D. H.; LEE, S. K.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 1244-8, Apr. 2002.

SHURRAB, M. Y. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 7, n. 4, p. 053-062, Sep. 2006.

SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; GHIASUDDIN, H. E. J. Constituents of *Azadirachta indica*: isolation and structure elucidation of a new antibacterial tetranortriterpenoid, mahmoodin, and a new protolimonoid, naheedin. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 3, p. 303-10, Mar. 1992.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para a ciência do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1975.

SILVA, J. O.; FRANCESCHINI, S. A.; LAVRADOR, M. A. S.; CANDIDO, R. C. Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 157, n. 1, p. 29-36, Jan. 2004.

SILVEIRA, C. S.; SEMAAN, F. S.; MACIEL, E. V.; CHAVASCO, J. K. Avaliação da eficiência do porta-escovas na prevenção da contaminação de escovas dentais por coliformes fecais e parasitas intestinais. **Rev. CROMG**, v. 8, n. 1, p. 65-8, jan./fev./mar. 2002.

SOCRANSKY, S. S.; MANGANIELLO, S. D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 42, n. 8, p. 485-96, Aug. 1971.

STEERS, E.; FOLTZ, E. L.; GRAVES, B. S.; SURIANO, H. J. Comparison of bacterial susceptibility to antibiotics as determined by the plate dilution method and by the disc method. **Antibiot. Annu.**, v. 7, p. 604-13, 1959-1960.

SUBAPRIYA, R.; NAGINI, S. Medicinal properties of neem leaves: a review. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, San Francisco, v. 5, n. 2, p. 149-56, Mar. 2005.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 329-34, Feb. 1998.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNETT, D. E.; COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular

characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV- infected individuals. **Microbiology**, v. 141, p. 1507-21, Jul. 1995.

SVANBERG, M. Contamination of toothpaste and toothbrush by *Streptococcus mutans*. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 86, n. 5, p. 412-4, Sep. 1978.

TAJI, S. S.; ROGERS, A. H. The microbial contamination of toothbrushes: a pilot study. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 43, n. 2, p. 128-30, Apr. 1998.

TAPPER-JONES, L. M.; ALDRED, M. J.; WALKER, D. M.; HAYES, T. M. Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouth of diabetics. **J. Clin. Pathol.**, v. 34, n. 7, p. 706-11, Jul. 1981.

THÉRAUD, M.; BÉDOUIN, Y.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J. P. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1013-8, 2004.

UPADHYAY, S. N.; DHAWAN, S.; GARG, S.; TALWAR, G. P. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 14, n. 7, p. 1187-93, 1992.

VERRAN, J.; LEAHY-GILMARTIN, A.; WATSON, G. K.; HAMMOND, K.; HUNTINGTON, E.; RAVEN, S. J. Microbial contamination of toothbrushes during an in-home trial. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.76, p.437, 1997. Special Issue.

VIANNA, M. E.; GOMES, B. P. F. A.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n.1, p. 79-84, Jan. 2004.

WADE, W. G.; ADDY, M. Antibacterial activity of some triclosan-containing toothpastes and their ingredients. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 280-2, 1992.

WARREN, D. P.; GOLDSCHMIDT, M. C.; THOMPSON, M. B.; ADLER-STORTHZ, K.; KEENE, H. J. The effects of toothpastes on the residual microbial contamination of toothbrushes. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 132, n. 9, p. 1241-5, Sep. 2001.

WATSON, P. S.; PONTEFRACT, H. A.; DEVINE, D. A.; SHORE, R. C.; NATTRESS, B. R.; KIRKHAM, J.; ROBINSON, C. Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 84, n. 5, p. 451-5, May 2005.

WEBB, B. C.; THOMAS, C. J.; WHITTLE, T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. **Gerodontol.**, v. 22, p. 168-76, 2005.

WEBB, B. C.; THOMAS, C. J.; WILLCOX, M. D.; HARTY, D. W.; KNOX, K. W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Aust. Dent. J.**, v. 43, p. 45, 1998.

WETZEL, W.; SCHAUMBURG, C.; ANSARI, F.; KROEGER, T.; SZIEGOLEIT, A. Microbial contamination of toothbrushes with different principles of filament anchoring. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 136, n. 6, p. 758-65, Jun. 2005.

WORTHINGTON, H. V.; CLARKSON, J. E. Prevention of oral mucositis and oral candidiasis for patients with cancer treated with chemotherapy: Cochrane Systematic Review. **J. Dent. Educ.** , v. 66, n. 8, p. 903-11, Aug. 2002.

ZOLNOWSKI-CASEY, M. An infection control procedure that is the patient's responsibility. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 129, n. 5, p. 616-7, May 1998.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, ... portador do RG..... e CPF....., aluno matriculado no 2º período do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, participo voluntariamente da pesquisa "Contaminação de escovas dentais por *Candida* spp. e eficácia de sprays antimicrobianos para a sua desinfecção" a ser desenvolvida pela Pós-Graduanda (Doutorado) Andresa Piacezzi Nascimento, sob orientação da Profa. Dra. Izabel Yoko Ito.

Os objetivos do estudo serão avaliar:

- a contaminação de escovas dentais, utilizadas por estudantes universitários, por espécies de *Candida*;
- a eficácia do Periogard® e do Neem Sattiva®, sob a forma de spray, na desinfecção de escovas dentais utilizadas por estudantes universitários, tendo como controle a água destilada esterilizada;
- a capacidade da *C. albicans* aderir sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais e formar biofilme, *in vitro*, empregando a técnica de cultura microbiana e microscopia eletrônica de varredura.

Estou ciente de que esta pesquisa é científica, e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou apresentada em jornadas, congressos e reuniões científicas no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o código de ética.

Declaro que fui devidamente esclarecido (de forma oral e por escrito) que:

- O material obtido será utilizado para uma pesquisa na área de microbiologia aplicada.
- Cada participante receberá três escovas (uma por semana), e será instruído a escovar os dentes durante 2,0 minutos.

- Este procedimento não irá causar nenhum prejuízo à integridade física, nenhum desconforto ou risco.

Tenho plena liberdade de, a qualquer momento, retirar/desistir da participação.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsável a Profa. Dra. Izabel Yoko Ito.

Assim, assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo e a importância da minha participação.

Ribeirão Preto, de de 2006.

_____
VOLUNTÁRIO

Profa. Dra. Izabel Yoko Ito	Andresa Piacezzi Nascimento Pós-Graduanda

APÊNDICE B – Dados obtidos após a conversão das respostas do tipo “positivo” (+) em valor numérico 1 (um), e das respostas do tipo “negativo’ (-) em valor numérico 0 (zero)

Indivíduo	Água destilada esterilizada	Periogard®	Neem Sattiva®
12	1	1	1
13	1	1	1
16	1	1	1
20	1	1	1
21	1	0	1
23	1	1	1
26	1	1	1
33	1	1	1
34	1	1	1
35	1	1	1
38	1	0	0
41	1	0	1
43	1	1	1
45	1	0	1
47	1	0	1
48	1	0	1
49	1	1	1
50	1	0	1
54	1	1	1
55	1	1	1
56	1	0	1
57	1	0	0

APÊNDICE C – Resultados do teste dos sinais

Tabela 6 – Comparação entre água destilada esterilizada e Periogard®, de acordo com o teste dos sinais

Valores binominais calculados	0
Probabilidades de H_0 para esses valores	
a) em testes monocaudais	0,0000%
b) em testes bicaudais	0,0000%
Significante ao nível de 1%	α = 0,01

Tabela 7 – Comparação entre água destilada esterilizada e Neem Sattiva®, de acordo com o teste dos sinais

Valores binominais calculados	0
Probabilidades de H_0 para esses valores	
a) em testes monocaudais	0,0000%
b) em testes bicaudais	0,0000%
Significante ao nível de 1%	α = 0,01

Tabela 8 – Comparação entre Periogard® e Neem Sattiva®, de acordo com o teste dos sinais

Valores binominais calculados	0
Probabilidades de H_0 para esses valores	
a) em testes monocaudais	0,0000%
b) em testes bicaudais	0,0000%
Significante ao nível de 1%	α = 0,01

APÊNDICE D – Escores das diluições dos antissépticos, nas quais as cepas de *Candida* spp. foram inibidas

Neem Sattiva®	Periogard®	CHX
2	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	4
3	3	5
3	3	5
3	3	5
3	3	5
3	3	5
3	3	5
3	3	5
3	3	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	5
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
3	4	6
4	5	7
4	5	8

CHX: solução de gluconato de clorexidina a 0,5%

APÊNDICE E – Comparações múltiplas de acordo com o teste de Kruskal-Wallis

Comparação dos antissépticos	Diferenças entre médias	Valor de p
Neem Sattiva® X Periogard®	43,5238	p<0,001
Neem Sattiva® X CHX	107,9048	p<0,001
Periogard® X CHX	64,3810	p<0,001

CHX: solução de gluconato de clorexidina a 0,5%

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. do Café, s/nº - Fone: (0xx16) 3602.4213 - Fax: (0xx16) 3602-4877
14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Of. CEP 17/2006 - FCFRP/USP
rlq

Ribeirão Preto, 05 de julho de 2006.

Prezada Doutoranda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "Contaminação de escovas dentais por *Candida spp.* e eficácia de sprays antimicrobianos para a sua desinfecção", apresentado por V. Sa. a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 76, foi analisado na 50ª reunião deste CEP, realizada no dia 04 de julho de 2006 e considerado **aprovado.**

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do CEP
FCFRP – USP

Ilma. Sra.
ANDRESA PIACEZZI NASCIMENTO
Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP - USP

ANEXO B – Tabela de números ao acaso

Tabela A6.7 Números ao acaso

25 19 64 82 84	62 74 29 92 24	61 03 91 22 48	64 94 63 15 07	66 85 12 00 27
23 02 41 46 04	44 31 52 43 07	44 06 03 09 34	19 83 94 62 94	48 28 01 51 92
55 85 66 96 28	28 30 62 58 83	65 68 62 42 45	13 08 60 46 28	95 68 45 52 43
68 45 19 69 59	35 14 82 56 80	22 06 52 26 39	59 78 98 76 14	36 09 03 01 86
69 31 46 29 85	18 88 26 95 54	01 02 14 03 05	48 00 26 43 85	33 93 81 45 95
37 31 61 28 98	94 61 47 03 10	67 80 84 41 26	88 84 59 69 14	77 32 82 81 89
66 42 19 24 94	13 13 38 69 96	76 69 76 24 13	43 83 10 13 24	18 32 84 85 04
33 65 78 12 35	91 59 11 38 44	23 31 48 75 74	05 30 08 46 32	90 04 93 56 16
76 32 06 19 35	22 95 30 19 29	57 74 43 20 90	20 25 36 70 69	38 32 11 01 01
43 33 42 02 59	20 39 84 95 61	58 22 04 02 99	99 78 78 83 82	43 67 16 38 95
28 31 93 43 94	87 73 19 38 47	54 36 90 98 10	83 43 32 26 26	22 00 90 59 22
97 19 21 63 34	69 33 17 03 02	11 15 50 46 08	42 69 60 17 42	14 68 61 14 48
82 80 37 14 20	56 39 59 89 63	33 90 38 44 50	78 22 87 10 88	06 58 87 39 67
03 68 03 13 60	64 13 09 37 11	86 02 57 41 99	31 66 60 65 64	03 03 02 58 97
65 16 58 11 01	98 78 80 63 23	07 37 66 20 56	20 96 06 79 80	33 39 40 49 42
24 65 58 57 04	18 62 85 28 24	26 45 17 82 76	39 65 01 73 91	50 37 49 38 73
02 72 64 07 75	85 66 48 38 73	75 10 96 59 31	48 78 58 08 88	72 08 54 57 17
79 16 78 63 99	43 61 00 66 42	76 26 71 14 33	33 86 76 71 66	37 85 05 56 07
04 75 14 93 39	68 52 16 83 34	64 09 44 62 58	48 32 72 26 95	32 67 35 49 71
40 64 64 57 60	97 00 12 91 33	22 14 73 01 11	83 97 68 95 65	67 77 80 98 87
06 27 07 34 26	01 52 48 69 57	19 17 53 55 96	02 41 03 89 33	86 85 73 02 32
62 40 03 87 10	96 88 22 46 94	35 56 60 94 20	60 73 04 84 98	96 45 18 47 07
00 98 48 18 97	91 51 63 27 95	74 25 84 03 07	88 29 04 79 84	03 71 13 78 26
50 64 19 18 91	98 55 83 46 09	49 66 41 12 45	41 49 36 83 43	53 75 35 13 39
38 54 52 25 78	01 98 00 89 85	86 12 22 89 25	10 10 71 19 45	88 84 77 00 97
46 86 80 97 73	65 12 64 64 70	58 41 05 49 08	68 68 88 54 00	81 61 61 80 41
90 72 92 93 10	09 12 81 93 63	69 30 02 04 26	92 36 48 69 45	91 99 08 07 65
66 21 41 77 60	99 35 72 61 22	52 40 74 67 29	97 50 71 39 79	57 82 14 88 06
87 05 46 52 76	89 96 34 22 37	27 11 57 04 19	57 93 08 35 69	07 51 19 92 66
46 90 61 03 06	89 85 33 22 80	34 89 12 29 37	44 71 38 40 37	15 49 55 51 08
11 88 53 06 09	81 83 33 98 29	91 27 59 43 09	70 72 51 49 73	35 97 25 83 41
11 05 92 06 97	68 82 34 08 83	25 40 58 40 64	56 42 78 54 06	60 96 96 12 82
33 94 24 20 28	62 42 07 12 63	34 39 02 92 31	80 61 68 44 19	09 92 14 73 49
24 89 74 75 61	61 02 73 36 85	67 28 50 49 85	37 79 95 02 66	73 19 76 28 13
15 19 74 67 23	61 38 93 73 68	76 23 15 58 20	35 36 82 82 59	01 33 48 17 66
05 64 12 70 88	80 58 35 06 88	73 48 27 39 43	43 40 13 35 45	55 10 54 38 50
57 49 36 44 06	74 93 55 39 26	27 70 98 76 68	78 36 26 24 06	43 24 56 40 80
77 82 96 96 97	60 42 17 18 48	16 34 92 19 52	98 84 48 42 92	83 19 06 77 78
24 10 70 06 51	59 62 37 95 42	53 67 14 95 29	84 65 43 07 30	77 54 00 15 42
50 00 07 78 23	49 54 36 85 14	18 50 54 18 82	23 79 80 71 37	60 62 95 40 30
44 37 76 21 96	37 03 08 98 64	90 85 59 43 64	17 79 96 52 35	21 05 22 59 30
90 57 55 17 47	53 26 79 20 38	69 90 58 64 03	33 48 32 91 54	68 44 90 24 25
50 74 64 67 42	95 28 12 73 23	32 54 98 64 94	82 17 18 17 14	55 10 61 64 29
44 04 70 22 02	84 31 64 64 08	52 55 04 24 29	91 95 43 81 14	66 13 18 47 44
32 74 61 64 73	21 46 51 44 77	72 48 92 00 05	83 59 89 65 06	53 76 70 58 78
75 73 51 70 49	12 53 67 51 54	38 10 11 67 73	22 32 61 43 75	31 61 22 21 11
76 18 36 16 34	16 28 25 82 98	64 26 70 54 87	49 48 55 11 39	94 25 20 80 85
00 17 37 71 81	64 21 91 15 82	81 04 14 52 11	39 07 30 60 77	39 18 27 85 68
54 95 57 55 04	12 77 40 70 14	79 86 61 57 50	52 49 41 73 46	05 63 34 92 33
69 99 95 54 63	44 37 33 53 17	38 06 58 37 93	47 10 62 31 28	63 59 40 40 32

Fonte: Costa Neto (1977)