

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de
enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida***

MANUELA LUIZA TOTI RODRIGUES

Ribeirão Preto-SP

2008

MANUELA LUIZA TOTI RODRIGUES

Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Celia Candido

Ribeirão Preto-SP

2008

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.

Toti-Rodrigues, Manuela Luiza.

Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*. Ribeirão Preto, 2008.

71 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Candido, Regina Celia.

1. *Candida*.
2. anti-sépticos bucais.
3. microdiluição em caldo.
4. macrodiluição em caldo.
5. difusão em ágar

FOLHA DE APROVAÇÃO

Manuela Luiza Toti Rodrigues

Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Celia Candido

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, com amor, admiração e
gratidão por sua compreensão, carinho,
presença e incansável apoio a todas as minhas
escolhas e desistências.*

Homenagem Especial

A minha avó Ana pelo carinho e pelas “lições de vida”.

Ao Luís Otávio pelo sorriso sincero, apoio incondicional em todos os momentos e compreensão nas horas mais difíceis.

As amigas Thaís, Ivana e Beatriz pelos conselhos experientes de quem já traçou os mesmos caminhos.

Ao Johannes e ao Jack pelas palavras sábias e acalentadoras.

Agradecimientos

À Prof^a. Dr^a. Regina Celia Candido pelos ensinamentos e orientação.

À Faculdade De Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos colegas de pós-graduação pela excelente convivência durante a elaboração deste trabalho.

À Joseane Cristina Ferreira, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pelos ensinamentos e pela colaboração na execução dos experimentos.

À Solange Aparecida Fernandes Bocado, funcionária do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP pelo suporte para a realização dos experimentos.

À Ludmila Tonani, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Sicchiroli Lavrador pela colaboração na análise estatística dos dados.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado.

Muito Obrigada!

" Qual é a sua estrada, homem? - a estrada do místico, a estrada do louco, a estrada do arco-íris, a estrada dos peixes, qualquer estrada... Há sempre uma estrada em qualquer lugar, para qualquer pessoa, em qualquer circunstância. Como, onde, por quê? "

Jack Kerouac

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	iv
Lista de quadros.....	vi
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O gênero <i>Candida</i>	2
1.2 Candidíase bucal.....	3
1.3 Agentes antimicrobianos e o controle do biofilme bucal.....	4
1.4 Anti-sépticos bucais.....	5
1.5 Testes de suscetibilidade <i>in vitro</i>	8
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Cepas.....	18
3.2 Anti-sépticos bucais.....	18
3.3 Meios de cultivo	19
3.3.1 Ágar Sabouraud dextrose.....	19
3.3.2 RPMI-1640	19
3.3.3 Ágar RPMI 1640.....	20
3.3.4 Mueller-Hinton.....	21
3.3.5 Ágar Mueller-Hinton.....	21
3.4 Suspensão inicial do inóculo.....	22
3.5 Microdiluição em caldo.....	23
3.6 Macrodiluição em caldo.....	27
3.7 Difusão em ágar.....	31
3.8 Determinação da concentração fungicida mínima.....	34
3.9 Análise dos Resultados.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Valores de CIM obtidos pela macro e microdiluição	36
4.1.1 <i>Candida albicans</i> ATCC 64548.....	36
4.1.2 <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030.....	37
4.1.3 <i>Candida krusei</i> ATCC 6258.....	38
4.1.4 <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	39
4.1.5 <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750.....	40
4.2 Halos de inibição obtidos pela difusão em ágar.....	41
4.2.1 <i>Candida albicans</i> ATCC 64548.....	41
4.2.2 <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030.....	42
4.2.3 <i>Candida krusei</i> ATCC 6258.....	43
4.2.4 <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	44
4.2.5 <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750.....	45
4.3 Coeficiente <i>kappa</i>	46
4.3.1 Comparação entre os meios de cultura na macro e microdiluição.....	46
4.3.2 Comparação entre as metodologias de macro e microdiluição	47
4.4 Coeficiente de correlação de concordância.....	48
4.5 Ação inibitória e fungicida dos sete anti-sépticos bucais nas metodologias	

	macro e microdiluição.....	49
5.	DISCUSSÃO.....	50
6.	CONCLUSÕES.....	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	APÊNDICES.....	69

RESUMO

TOTI-RODRIGUES, M. L. **Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida***. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista freqüente, causada por leveduras do gênero *Candida*. A utilização de anti-sépticos como medida complementar na higiene oral é cada vez mais difundida. Sendo assim, é de grande importância a avaliação das metodologias que são utilizadas para avaliação da atividade antifúngica. A avaliação *in vitro* da sensibilidade de leveduras a anti-sépticos tem sido pouco relatada e os resultados nem sempre são concordantes, pois as metodologias são divergentes. O objetivo desse estudo foi avaliar três metodologias: macro e microdiluição em caldo e difusão em ágar por meio de poços, com utilização dos meios de cultura RPMI 1640 e Mueller-Hinton para suscetibilidade dos anti-sépticos bucais Listerine[®], Malvatricin[®] Dentes Sensíveis, Noplak[®]Max, Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®] frente a *C. albicans* ATCC 64548, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750. Em relação à comparação das concentrações inibitórias mínimas de cada meio de cultura, os índices *kappa* foram bons ou excelentes (0,73 a 1,00). Na metodologia da difusão em ágar o coeficiente de correlação de concordância entre os resultados dos meios de cultura também foi excelente (0,95 a 0,99). Concluímos que ambos os meios de cultura podem ser utilizados na avaliação da suscetibilidade de anti-sépticos bucais frente espécies de *Candida*, pois apresentaram índices de concordância e correlação de bom à excelente. Quanto à correlação entre as metodologias de macro e microdiluição, o *kappa* foi excelente (1,00) para todas as cepas no meio Mueller-Hinton e variou de 0,42 a 0,72 (bom a excelente) no meio RPMI-1640. As CIMs geradas pela macro e microdiluição em caldo são concordantes possibilitando a utilização de ambas as metodologias na avaliação de anti-sépticos bucais, no entanto a microdiluição detectou a ação inibitória de anti-sépticos voláteis em menores concentrações. A utilização da difusão em ágar é discutível visto que os anti-sépticos voláteis Listerine[®] e Malvatricin[®] não apresentaram atividade inibitória nesta metodologia. Todos os anti-sépticos avaliados apresentaram atividade fungistática e fungicida *in vitro* pelas metodologias de diluição frente a cepas ATCC de *Candida* quando avaliado na formulação disponibilizada pelos fabricantes. Os anti-sépticos bucais Oral B[®] e Periogard[®] apresentaram ações inibitórias (CIM) e fungicidas (CFM) de 1,25% para todas as cepas, meios e metodologias. O Noplak[®] e o Plax[®], CIM e CFM variando de 1,25% a 2,5% para todas as cepas, meios e metodologias. Os anti-sépticos Listerine[®] e Malvatricin[®] apresentaram CIM de 5% a 50% e CFM de 5% a 100% dependendo do meio e metodologia. O anti-séptico Reach[®] apresentou CIM e CFM variando de 1,25% a 50% dependendo da cepa avaliada. Estudos com maior número de isolados, maior diversidade de espécies, concentrações intermediárias de anti-séptico e resultados interlaboratoriais poderão contribuir na padronização de métodos para avaliação de anti-sépticos bucais.

Palavras chave: *Candida* spp., anti-sépticos bucais, microdiluição em caldo, macrodiluição em caldo, difusão em ágar.

ABSTRACT

TOTI-RODRIGUES, M. L. **Evaluation of methods for *in vitro* susceptibility testing of mouthwashes against species of the gender *Candida***. 2008. 71 f. Dissertation (Master's Degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Candidosis is a frequent opportunistic fungal infection caused by yeasts of the gender *Candida*. The use of mouthwashes as a preventive measure in oral hygiene has been more and more diffused. Therefore it is of great importance the evaluation of the methodologies that are used on the antifungal evaluation. The *in vitro* evaluation of yeast susceptibility to mouthwashes has been little reported and the results are not always in agreement. The goal of this study was to evaluate three methodologies: broth macro and microdilution and agar well diffusion, using the media RPMI 1640 and Mueller-Hinton on the susceptibility of the mouthwashes Listerine[®], Malvatricin[®] Dentes Sensíveis, Noplak[®]Max, Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®] against *C. albicans* ATCC 64548, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750. The *kappa* indexes for the comparison between the minimal inhibitory concentrations obtained with each culture medium were good to excellent (0,73 to 1,00). On the agar well diffusion method, the concordance correlation coefficients between the results obtained with the different media were also excellent (0,95 to 0,99). We concluded that both culture media can be used to evaluate the susceptibility of mouthwashes against species of *Candida* because they have concordance and correlations that go from good to excellent. The *kappa* indexes for the correlation between the broth macro and microdilution methodologies were excellent (1,00) for all the isolates in the Mueller-Hinton media and varied from 0,42 to 0,72 (good to excellent) with RPMI 1640. The MICs generated by broth macro and microdilution agree which makes it possible to use both methodologies on the evaluation of mouthwashes; however the microdilution detects the inhibitory action of volatile mouthwashes at smaller concentrations. The use of the agar well diffusion method is not advised since the volatile mouthwashes Listerine[®] and Malvatricin[®] have not presented inhibitory action in that methodology. All the evaluated mouthwashes presented fungistatic and fungicide activity at the formulation available in the market. The mouthwashes Oral B[®] and Periogard[®] presented MICs and MFCs of 1,25% for all strains, methodologies and media. Noplak[®] and Plax[®], MIC and MFC that ranged from 1,25% to 2,5% for all strains, methodologies and media. The mouthwashes Listerine[®] and Malvatricin[®] MICs ranged from 5% to 50% and MFCs from 5% to 100% depending on media and methodology. The mouthwash Reach[®] presented MICs and MFCs ranging from 1,25% to 50% depending on the strain evaluated. Studies with a higher number of strains, bigger variety of species, intermediary concentrations of mouthwashes and interlaboratory results can contribute to the standardization of methods to evaluate mouthwashes.

Keywords: *Candida* spp., mouthwashes, broth microdilution, broth macrodilution, agar well diffusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da diluição dos anti-sépticos para microdiluição em caldo	23
Figura 2. Fluxograma da distribuição dos anti-sépticos bucais para microdiluição em caldo	24
Figura 3. Fluxograma da distribuição do inóculo e incubação para microdiluição em caldo	26
Figura 4. Fluxograma da diluição dos anti-sépticos bucais para macrodiluição em caldo.....	27
Figura 5. Fluxograma da distribuição dos anti-sépticos bucais para macrodiluição em caldo	28
Figura 6. Fluxograma da distribuição do inóculo e incubação para microdiluição em caldo	30
Figura 7. Fluxograma da diluição dos anti-sépticos bucais para difusão em ágar	31
Figura 8. Fluxograma do teste de suscetibilidade de <i>Candida</i> a anti-sépticos bucais para difusão em ágar	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a <i>C. albicans</i> ATCC 64548 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.....	36
Tabela 2 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.....	37
Tabela 3 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a <i>C. krusei</i> ATCC 6258 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.....	38
Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.....	39
Tabela 5 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) para suscetibilidade de <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 frente a sete anti-sépticos bucais avaliada pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.....	40
Tabela 6 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a <i>C. albicans</i> ATCC 64548, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton	41
Tabela 7 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a <i>C. glabrata</i> ATCC 90030, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton	42
Tabela 8 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a <i>C. krusei</i> ATCC 6258, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton	43
Tabela 9 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton	44
Tabela 10 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a <i>C. tropicalis</i> ATCC 750, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton	45
Tabela 11 - Valores de coeficiente <i>kappa</i> e da concordância absoluta (%) da comparação entre os meios de cultura utilizados nas metodologias de micro e macrodiluição em caldo	46

Tabela 12 - Valores de coeficiente <i>kappa</i> e da concordância absoluta (%) da comparação entre as metodologias com meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.....	47
Tabela 13 - Valores de CCC da comparação entre os meios de cultura RPMI-1640 e Mueller- Hinton na difusão em ágar	48
Tabela 14 - Intervalo de valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para suscetibilidade de sete anti-sépticos bucais frente a <i>Candida</i> sp avaliadas pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo no meio RPMI-1640	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anti-sépticos bucais e seus princípios ativos	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Saboraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CCC	Coeficiente de Correlação de Concordância
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
USP	Universidade de São Paulo

1. Introdução

1.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* é composto por aproximadamente 200 espécies de leveduras com capacidades assimilatórias, oxidativas e fermentativas que permitem a utilização de várias e diferentes substâncias orgânicas para nutrição. *Candida albicans* é um fungo que apresenta formas leveduriformes (blastocônídios) no estado saprofítico, associadas à colonização assintomática; ou formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo “pleomórfico” (KURTZMANN & FELL, 1998).

As leveduras do gênero *Candida* vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (BERMAN & SUDBERRY, 2002; SILVA *et al.*, 2002; FERRAZZA *et al.*, 2005). São patógenos oportunistas frequentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais. Estão muito bem adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica. Colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena (ODDS, 1988; BERMAN & SUDBERRY, 2002).

A patogenicidade ou virulência de um microrganismo é definida como sua capacidade de determinar doença, e é mediada por múltiplos fatores. Embora sejam determinados geneticamente, eles são expressos pelos microrganismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Os principais fatores de virulência para as espécies de *Candida* são a aderência, a hidrofobicidade da superfície celular, a produção de tubo germinativo, a produção de exoenzimas, o tigmotropismo e o *switching* fenotípico (MCCULLOUGH *et al.*, 1996; DE BERNARDIS *et al.*, 2001; SOLL, 2002; ALVARES *et al.*, 2007).

Segundo Ghannoum e Abu-Elteen (1990) existe um modelo de patogenicidade da infecção por *Candida*. A aderência parece ser o mecanismo inicial da virulência, ocorre logo após a multiplicação das leveduras, formação do tubo germinativo e filamentos no caso de *C. albicans*, tal fase é seguida pela produção de enzimas (fosfolipase e proteinase), que causam dano nos tecidos, permitindo a penetração da levedura e a resposta inflamatória nos tecidos subjacentes.

1.2 Candidíase bucal

A candidíase bucal é uma infecção oportunista da cavidade bucal que tem início através da proliferação das leveduras comensais endógenas que habitam a cavidade bucal. É comum em idosos, principalmente portadores de próteses, crianças na primeira infância e em pessoas imunocomprometidas, atuando como marcador de doenças sistêmicas (AKPAN& MORGAN, 2002).

A espécie *C. albicans* é a mais associada à candidíase bucal, no entanto espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* também podem estar associadas à candidíase bucal (ODDS, 1988; AZEVEDO *et al.*, 1999). Recentemente, a candidíase bucal tem sido associada a *C. dubliniensis* em portadores de HIV (SULLIVAN *et al.*, 1995).

A classificação da candidíase oral é difícil devido ao seu polimorfismo clínico. Atualmente tem sido disposta em duas categorias com base na distribuição das lesões: Categoria I ou candidíase oral primária que inclui infecções por *Candida* confinadas aos tecidos orais e a Categoria II ou candidíase oral secundária que agrega desordens onde a candidíase oral é uma manifestação da infecção por *Candida* na forma mucocutânea, sistêmica ou generalizada (FARAH *et al.*, 2000).

O prognóstico para a candidíase bucal é bom desde que haja tratamento apropriado com antifúngicos tópicos ou sistêmicos acompanhado de uma higiene bucal apropriada. A reincidência de candidíase bucal se deve a falha em algum destes procedimentos ou a incapacidade em solucionar os fatores predisponentes a infecção como o controle do diabetes, desinfecção das próteses, controle da dieta rica em carboidratos entre outros (AKPAN & MORGAN, 2002).

1.3 Agentes antimicrobianos e o controle do biofilme bucal

A sobrevivência dos microrganismos depende de sua habilidade em se ligar a superfícies. O contato com uma superfície sólida desencadeia a expressão de várias enzimas que catalisam a formação de polissacarídeos, formando um biofilme constituído de camadas de células inclusas em uma matrix extracelular polissacarídica. O biofilme promove a colonização de uma superfície e a proteção dos microrganismos envolvidos, conferindo-lhes maior virulência e maior resistência a agentes antimicrobianos e ao sistema imune do hospedeiro (GILBERT *et al.*, 1997; LAMFON *et al.*, 2004).

Embora a formação do biofilme seja normal, na falta de uma higiene bucal adequada, ele pode se acumular além dos níveis compatíveis com a saúde dentária, causando cáries e doenças periodontais. Em alguns indivíduos, a higienização por escovação é insuficiente para a manutenção da saúde bucal. Conseqüentemente, a incorporação de agentes químicos com atividade antiplaca e antimicrobiana a produtos de higienização bucal é vista como medida profilática para a redução de doenças mediadas pelo biofilme bucal (MARSH, 1992).

Os efeitos dos agentes antimicrobianos no biofilme bucal podem depender diretamente da concentração do agente que chega até o sítio de ação. Os agentes podem apresentar inicialmente uma concentração alta, maior ou igual à concentração mínima que inibe o crescimento de microrganismos *in vitro* (CIM), mas com o tempo, uma grande parte do agente é perdida pela expectoração ou

deglutição. Sendo assim, os efeitos subseqüentes dependem da quantidade do agente que fica retido na superfície da mucosa oral (MARSH, 1992).

Os agentes antimicrobianos, normalmente, atuam pela supressão do crescimento de microrganismos ou pela destruição destes. Os critérios necessários para a utilização de quaisquer agentes antimicrobianos para o tratamento de microrganismos patogênicos são: a suscetibilidade do microrganismo ao agente antimicrobiano; a penetração deste agente no sítio de infecção; o alcance e manutenção de concentrações adequadas do agente no sítio de infecção; a baixa toxicidade do agente antimicrobiano às células do hospedeiro e o não desenvolvimento rápido de resistência a este agente. Esses critérios requerem o conhecimento dos microrganismos envolvidos na infecção, a suscetibilidade dos microrganismos aos diferentes agentes antimicrobianos e a farmacocinética do agente (WALKER, 1992).

O controle do biofilme bucal é assunto de interesse para a odontologia preventiva. A saúde bucal depende em grande parte do controle da formação do biofilme através da higienização e utilização de um arsenal de produtos, tais como dentifrícios, escova dental, fio dental e anti-sépticos bucais (NASCIMENTO, 2000).

A remoção do biofilme bucal é um fator importante na prevenção da cárie e de doenças periodontais. Frente a limitação dos métodos mecânicos de higiene, a utilização de agentes antimicrobianos na forma de anti-sépticos bucais mostra ser uma importante alternativa no controle do biofilme (JARDIM, 1998).

1.4 Anti-sépticos bucais

Anti-sépticos bucais são preparações líquidas com a função de exercer uma ação anti-séptica, adstringente e sedativa na cavidade bucal. São utilizados no tratamento sintomático de úlceras aftosas com algum sucesso e como terapia para infecções causadas por *Candida* spp., aliviando a dor e desconforto da inflamação (ZEGARELLI, 1991).

No Brasil, os anti-sépticos bucais são categorizados como produtos de higiene pessoal e cosméticos. As formulações que apresentam indicações específicas, como antimicrobianos, antiplaca e de uso infantil demandam comprovação da sua segurança e eficácia antimicrobiana (ANVISA, 2005).

A composição básica de um anti-séptico bucal não é complexa, ela apresenta um veículo (água, álcool ou glicerina), agentes flavorizantes, agentes surfactantes e corantes. A característica que diferencia estes produtos é a incorporação de agentes antimicrobianos, associados ou não a compostos fluoretados (ADAMS & ADDY, 1994; BUGNO *et al.*, 2007).

Os anti-sépticos bucais são utilizados no controle químico do biofilme bucal como substitutos ou adjuntos aos procedimentos mecânicos, além de serem facilitadores para a veiculação de compostos ativos para o tratamento de afecções específicas (BONADEO, 1988).

Os anti-sépticos bucais agem rompendo a parede celular e impedindo a atividade enzimática da célula microbiana. Agem adicionalmente prevenindo a agregação dos microrganismos e diminuindo sua multiplicação (ADAMS & ADDY, 1994).

A clorexidina, o cloreto de cetilpiridínio, o triclosan, os óleos essenciais e o xilitol estão entre os compostos ativos mais utilizados em anti-sépticos bucais (MC DONNELL & RUSSEL, 1999).

A clorexidina é uma biguanida catiônica que age principalmente sobre bactérias Gram-positivas e leveduras (MC DONNELL & RUSSEL, 1999). É um dos biocidas mais utilizados em formulações anti-sépticas, entre elas o Periogard® (Colgate, São Paulo, Brasil). Apresenta baixa toxicidade a células de mamíferos e alta afinidade para aderir a pele e as membranas mucosas. Seu mecanismo de ação inclui danos diretos à membrana citoplasmática do microrganismo, apresentando ação bacteriostática em pequenas dosagens e bactericida em altas concentrações (GEBRAN & GEBERT, 2002).

O cloreto de cetilpiridínio é um composto de amônia quaternária amplamente utilizado em anti-sépticos bucais como Noplak[®] Max (Daudt, Rio de Janeiro, Brasil), Oral B[®] (Gillette do Brasil, São Paulo, Brasil) e Reach[®] (Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). Presume-se que sua ação ocorra por ligações catiônicas muito semelhantes às que ocorrem com a clorexidina. O seu mecanismo de ação está relacionado com o aumento da permeabilidade da parede celular, que favorece a lise, diminui o metabolismo celular e a habilidade da bactéria em se aderir a superfície dentária. Ele age sobre bactérias Gram-positivas e leveduras (MARINHO, 2007).

Entre os compostos fenólicos, o triclosan (2,4,4'-triclora 2'-hidroxidifenileter), princípio ativo do Plax[®] (Colgate, São Paulo, Brasil), é o mais utilizado em formulações para o controle do biofilme bucal e age principalmente contra bactérias Gram-positivas. É um anti-séptico não iônico, de baixa toxicidade que não causa desequilíbrios na flora da cavidade bucal. Sua associação a copolímeros como Gantrez, citrato de zinco e pirofosfato de sódio, aumenta seu espectro de ação sobre bactérias Gram-negativas e leveduras. Estudos sugerem que além da atividade antimicrobiana, ele pode apresentar uma atividade antiinflamatória (MC DONNELL & RUSSEL, 1999; GEBRAN & GEBERT, 2002).

Os óleos essenciais timol, mentol e eucaliptol são normalmente utilizados como flavorizantes, desinfetantes, antifúngicos e como componentes de anti-sépticos bucais como o Listerine[®] (Pfizer, Guarulhos, Brasil). Apresentam propriedade antimicrobiana devido à presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes. Os agentes fenólicos atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas e leveduras, rompendo a parede celular, inibindo os sistemas enzimáticos e diminuindo os polissacarídeos do conteúdo protéico do biofilme (GEBRAN & GEBERT, 2002).

O xilitol, um pentiol que ocorre naturalmente em muitas frutas, grãos e vegetais, é um álcool que há muitos anos é usado como um adoçante artificial. Ele tem o mesmo valor calórico e dulçor da sacarose, porém não é cariogênico. Os

efeitos inibidores de cárie do xilitol atuam no crescimento e metabolismo do *Streptococcus mutans* e o biofilme dental e por isso ele é adicionado a anti-sépticos bucais como o Malvatricin[®] Dentes Sensíveis (Daudt, Rio de Janeiro, Brasil) como princípio ativo (LIMA & BERLINCK, 2003).

Devido ao caráter preventivo que a Odontologia vem assumindo, torna-se cada vez mais necessário o estudo e desenvolvimento de artifícios auxiliares à higiene visando evitar doenças bucais e manter a cavidade bucal saudável, através da realização de medidas que promovam a remoção eficiente e regular do biofilme bucal. A chave para a prevenção de doenças periodontais é o controle do biofilme bucal realizado através de recursos mecânicos, porém recursos químicos como a utilização de anti-sépticos bucais regularmente podem contribuir (QUILES *et al.*, 2007).

1.5 Testes de suscetibilidade *in vitro*

O estabelecimento do espectro de atividade de qualquer agente antimicrobiano é útil para melhorar o processo de controle da infecção. Em geral, há duas metodologias *in vitro* que são empregadas: o método de diluição, que permite a determinação da quantidade de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento do microrganismo e o método da difusão em ágar, que permite a observação de zonas de inibição adjacentes aos discos que contêm o agente antimicrobiano, que podem estar relacionadas ao seu efeito. Ambas as metodologias apresentam a desvantagem de serem indicadas somente para substâncias solúveis no meio de cultura. Por exemplo, no método de diluição, uma substância insolúvel no meio de cultura não entra em contato de forma homogênea com a suspensão do inóculo. Com relação ao método de difusão em ágar, o tamanho da zona de inibição microbiana, depende diretamente da solubilidade e da difusibilidade da substância avaliada e, portanto, pode não expressar efetivamente todo o seu potencial antimicrobiano (RODRÍGUEZ-TUDELLA *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), previamente conhecido como National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) é o comitê responsável pela padronização de todos os métodos utilizados em laboratórios clínicos, incluindo a área de microbiologia. Este conselho conta com a colaboração de profissionais de altíssimo nível para regulamentar métodos para o diagnóstico microbiológico e normas para a interpretação de seus resultados (NCCLS, 2002).

Em 1982, o NCCLS estabeleceu um subcomitê para discutir os testes de suscetibilidade de fungos a drogas antifúngicas, tendo em vista desenvolver um método de referência ou *gold standard* (GALGIANI, 1987). Durante os anos seguintes, devido a uma série de colaborações interlaboratoriais, chegou-se a um consenso que culminou na publicação do documento M27-P em 1992 (GALGIANI, 1993).

O documento proposto (M27-P) descrevia a metodologia e a interpretação dos testes de sensibilidade a antifúngicos para *Candida* spp. O documento sofreu alterações que levaram à publicação em 1995 de um documento tentativo (M27-T) e mais tarde, em 1997, de um documento aprovado (M27-A). Este documento mostra as vantagens do método da macrodiluição em caldo, entre eles sua altíssima reprodutibilidade interlaboratorial (REX *et al.*, 2001). A padronização do teste *in vitro* foi realizada em relação às variáveis, tamanho do inóculo, composição do meio, temperatura e tempo de incubação, e determinação do ponto final da concentração inibitória mínima - CIM (NCCLS, 2002; HOFFMAN & PFALLER, 2001). Inicialmente o método de referência foi definido somente com a metodologia da macrodiluição, mas foi estendido com a metodologia da microdiluição incluída no documento M27-T. O método da microdiluição se tornou o método de escolha por sua natureza menos dispendiosa, em que placas de microdiluição podem ser facilmente preparadas e congeladas bem antes do uso (REX *et al.*, 2001). Atualmente os documentos em vigor são o M27-A2 e seu suplemento, o M27-S2 publicados pelo CLSI respectivamente em 2002 e 2006.

Dentre as publicações que contribuíram para as padronizações do NCCLS, destacamos a de Pfaller e cols (1990), Espinel-Ingroff e cols (1991) Barchiesi e cols (1994), Sewell e cols (1994) e Tiballi e cols (1995).

Um estudo colaborativo realizado pelo NCCLS, hoje CLSI, em 1990 utilizou a metodologia da macrodiluição em caldo para avaliar o efeito do meio de cultura, tempo (24h e 48h) e temperatura (30°C e 35°C) de incubação nas CIMs para anfotericina B, fluocitosina e cetoconazol frente a cepas do gênero *Candida* e do gênero *Cryptococcus*. Quatro tipos de meios de cultura quimicamente definidos e tamponados foram testados: base nitrogênio para leveduras, RPMI 1640, meio sintético de aminoácidos e meio de alta resolução para ensaios com antifúngicos. A maior concordância entre os resultados obtidos pelos diferentes laboratórios ocorreu com o meio de cultura RPMI 1640, a 35°C com período de incubação de 48 horas. A concordância obtida entre os laboratórios nessas condições para anfotericina B foi de 81%, cetoconazol de 93% e para fluocitosina foi de 100% (PFALLER *et al.*, 1990)

Espinel-Ingroff e cols. (1991) avaliaram a concentração Inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, cetoconazol e cilofungin frente 38 cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Torulopsis glabrata* pelas metodologias de macro e microdiluição em caldo. Para o teste, foram utilizados os parâmetros indicados pelo NCCLS: inóculo de 1 a 5 x 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), meio RPMI 1640 e incubação a 37°C de 24 a 48 horas. Constataram que as CIMs foram mais altas na microdiluição para todos as cepas avaliadas com anfotericina B e para a maioria dos isolados com cetoconazol, fluconazol e cilofungin. A análise estatística mostrou que as discrepâncias existentes entre os resultados encontradas por ambas as metodologias não eram significantes estatisticamente, exceto pelos resultados da anfotericina B com todos os isolados, cetoconazol com *C. neoformans* e cilofungin frente a *C. albicans*. Concluíram que é possível o uso da microdiluição como alternativa à macrodiluição, porém seguindo as recomendações do NCCLS.

Outro grupo que realizou um estudo comparativo entre a macro e a microdiluição em caldo foi o de Barchiesi e cols (1994). Eles avaliaram a suscetibilidade de 273 leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* com os antifúngicos fluconazol, itraconazol, fluocitosina e anfotericina B. Observaram que a concordância entre as metodologias foi maior que 85,7% para o itraconazol e maior que 90% para os demais antifúngicos, concluindo que a concordância entre as metodologias é bastante alta.

Sewell e cols (1994) compararam os resultados obtidos pela macro e microdiluição em caldo na suscetibilidade de 238 isolados clínicos de *Candida* spp. com o fluconazol. De forma geral, a correlação obtida entre a macro e microdiluição em caldo foi de 93% com leitura dos resultados em 24 horas e de 94% com leitura dos resultados em 48 horas, o que demonstra excelente correlação entre as metodologias.

Tiballi e cols em 1995 determinaram por meio de macro e microdiluição em caldo, a suscetibilidade de 140 isolados de *C. glabrata* frente ao fluconazol e ao itraconazol, utilizando o meio de cultura RPMI 1640, inóculo de $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL e incubação por 48 horas a 35°C. Observaram que a correlação entre as metodologias é alta, sendo de 87% para o fluconazol e 86% para o itraconazol.

A metodologia da difusão em ágar por meio de discos é um método simples para se realizar testes de suscetibilidade *in vitro*, no entanto, nem todos os antimicrobianos estão disponíveis em discos ou podem ser aplicados a eles devido a suas características físico-químicas. Em uma tentativa de solucionar estes problemas, Magaldi em 1997 desenvolveu uma modificação da metodologia de difusão em ágar por meio de discos, substituindo-os por poços escavados no próprio meio de cultura onde diluições do agente antimicrobiano são colocadas e podem se difundir pelo meio de cultura assim como se difundem a partir dos discos. Esta metodologia permite a avaliação de qualquer antimicrobiano frente a fungos leveduriformes ou dermatófitos. A metodologia se mostrou econômica, simples e apresentou resultados confiáveis e compatíveis com os obtidos na utilização de

discos para o teste de suscetibilidade de espécies de *Candida* (MAGALDI *et al.*, 1997).

A técnica de difusão em ágar por poços para a determinação da CIM é comumente utilizada em testes de sensibilidade de microrganismos a antifúngicos, extratos de plantas, anti-sépticos e desinfetantes (ESTRELA *et al.*, 2001; DRUMOND *et al.*, 2004; MAGALDI *et al.*, 2004; SALVADOR *et al.*, 2004) por apresentar simplicidade e acuidade, e ser facilmente adaptada a qualquer laboratório.

Magaldi e cols (2004) avaliaram a atividade do fluconazol, itraconazol, posaconazol, caspofungin e anfotericina B frente a 158 cepas de *Candida* spp. simultaneamente pelas metodologias da microdiluição em caldo e difusão em ágar por meio de poços. Observaram que não houve diferença significativa entre as metodologias para todos os agentes antifúngicos avaliados. No entanto, uma diferença significativa foi observada para o fluconazol, respectivamente, no CIM₅₀ para *C. albicans* e CIM₈₀ para *C. glabrata* e *C. albicans*. Concluíram que a difusão em ágar é um teste simples, fácil de reproduzir, econômico, de fácil leitura e interpretação, além de demonstrar boa correlação com o método de referência do NCCLS podendo representar uma alternativa para a avaliação da suscetibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos.

A avaliação da ação antimicrobiana dos produtos anti-sépticos bucais tem sido realizada por testes *in vivo* ou *in vitro*, sendo que estes são geralmente adaptações dos procedimentos de difusão em ágar, da determinação da concentração inibitória mínima ou, ainda dos ensaios para a determinação de tempo da redução decimal (MARSH, 1992).

Navarro e cols (1995) verificaram a ação *in vitro* dos anti-sépticos bucais Periogard[®], Malvona[®], Cepacol[®] e Listerine[®] frente a cepas de *C. albicans* isoladas de próteses totais superiores. Para os testes, foi utilizada a metodologia da difusão em ágar pelo método do poço. O teste revelou que os anti-sépticos Periogard[®],

Malvona[®] e Cepacol[®] foram ativos em 100% dos casos enquanto o Listerine[®] foi ativo em somente 58,8% deles.

Candido e cols (1996) determinaram a CIM de três anti-sépticos, Periogard[®], Malvona[®] e Cepacol[®] frente a 30 cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal pela metodologia de diluição em meio sólido. Constataram que Periogard[®] foi o agente mais eficaz, pois inibiu todas as cepas na concentração de 6,4 µg/mL, Malvona[®] e Cepacol[®] inibiram respectivamente 30% e 0% das cepas nessa concentração. A inibição de 100% das cepas por estes produtos ocorreu na concentração 25,6 µg/mL, que é menor do que a recomendada para o uso.

Giuliana e cols (1997) investigaram a atividade antifúngica de enxaguatórios bucais contendo cloreto de cetilpiridínio, digluconato de clorexidina, hexetina, sanguinarina e triclosan, através da metodologia da macrodiluição em caldo. Verificaram que os produtos contendo cloreto de cetilpiridínio foram mais efetivos e os anti-sépticos contendo triclosan e hexetina não apresentaram ação fungicida sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*.

Azevedo e cols (1999) isolaram e identificaram espécies de *Candida* da cavidade bucal de indivíduos com e sem lesões. Dentre as cepas colhidas de pacientes sem lesão, 70 foram analisadas quanto a sua suscetibilidade aos antimicrobianos Própolis e Periogard[®] pela metodologia da diluição em meio sólido. Constataram que 67 das cepas eram sensíveis a ambos os antimicrobianos, com a Própolis apresentando diluição inibitória máxima (DIM) de 1:20 em 77,1% dos casos e o Periogard[®] com DIM 1:160 em 60% dos casos. Estes resultados indicam a possível utilização de Própolis e Periogard para a prevenção ou tratamento da candidíase oral.

Meiller e cols (2001) analisaram a eficácia dos anti-sépticos bucais Listerine[®], Listerine[®] antitártaro e Peridex[®] além de uma solução de gluconato de clorexidina 0,2% contra fungos patogênicos, incluindo cepas de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. As avaliações foram pelas metodologias de macrodiluição em caldo, tempo de morte da suspensão e

teste de morte em biofilme em porcelana. Constataram que todos os antimicrobianos avaliados foram eficazes frente às espécies investigadas nas concentrações disponíveis no comércio. O Listerine® foi o anti-séptico que demonstrou os maiores valores de CIM e CFM na metodologia da macrodiluição.

Drumond e cols em 2004 também utilizaram a metodologia da difusão em ágar pelo método do poço para a análise da suscetibilidade de microrganismos cariogênicos do gênero *Streptococcus* contra produtos fitoterápicos como Água Rabelo®, Malvatricin®, Mel Rosado®, Própolis, Fitogargarejo® e Óleo de Copahyba®. Os produtos apresentaram desempenhos variados, sendo o Malvatricin® o que obteve a menor CIM frente todas as linhagens, bem como os maiores espectros de inibição. A Água Rabelo® não apresentou qualquer atividade antimicrobiana.

Vários estudos sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* de anti-sépticos bucais comerciais e de seus princípios ativos vêm sendo publicados (CANDIDO *et al.*, 1996; AZEVEDO *et al.*, 1999; MEILLER *et al.*, 2001; DUMOND *et al.*, 2004). No entanto, na maioria dos casos, as metodologias empregadas não são as mesmas atualmente padronizadas para a avaliação antimicrobiana de antifúngicos. A avaliação destas metodologias para anti-sépticos bucais frente a leveduras ainda é pouco explorada.

2. Objetivos

OBJETIVOS

Verificar a correlação entre os meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton nos testes de suscetibilidade *in vitro* de anti-sépticos bucais pelas metodologias da macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e difusão em ágar por meio de poços.

Verificar a correlação entre as metodologias da microdiluição em caldo, macrodiluição em caldo e difusão em ágar para avaliar qual delas melhor se aplica ao teste de suscetibilidade de anti-sépticos bucais.

Analisar as ações fungistática e fungicida de sete anti-sépticos bucais, Listerine[®], Malvatricin[®] Dentes Sensíveis, Noplak[®] Max, Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®] frente a cinco cepas ATCC do gênero *Candida*.

3. Material e Métodos

3.1 Cepas

Foram avaliadas quanto a sensibilidade a anti-sépticos bucais as cepas padrão *C. albicans* ATCC 64548, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750.

3.2 Anti-sépticos bucais

Foram utilizados os anti-sépticos bucais discriminados no quadro 1, obtidos no comércio sob a forma de solução para bochecho.

Produto	Princípio ativo
Listerine [®] (Pfizer, Guarulhos, Brasil)	Timol, Eucaliptol, Mentol, Salicilato de Metila
Malvatricin [®] Dentes Sensíveis (Daudt, Rio de Janeiro, Brasil)	Xilitol
Noplak [®] Max (Daudt, Rio de Janeiro, Brasil)	Cloreto de Cetilpiridínio, Clorexidina
Oral-B [®] (Gillette do Brasil, São Paulo, Brasil)	Cloreto de Cetilpiridínio (sem álcool)
Periogard [®] (Colgate, São Paulo, Brasil)	Clorexidina
Plax [®] (Colgate, São Paulo, Brasil)	Triclosan
Reach [®] (Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil)	Cloreto de Cetilpiridínio (com álcool)

Quadro 1. Anti-sépticos bucais e seus princípios ativos

3.3 Meios de cultivo

3.3.1 Ágar Sabouraud dextrose (LACAZ, 1991)

Composição:

D- Glicose (Nuclear)	20 g
Peptona (Merck)	10 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15 g
Água destilada	1000 mL

Preparação:

Tubos: A peptona e o ágar foram suspensos em água destilada. Após a fusão do ágar, acrescentou-se a glicose e o meio foi distribuído em tubos e esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, os tubos foram solidificados em posição inclinada.

Placas: Os componentes foram adicionados em um balão. O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, foi resfriado a aproximadamente 60°C e vertidos aproximadamente 20 mL em placas de Petri esterilizadas de 20 x 100 mm.

3.3.2 RPMI 1640 tamponado com MOPS a 0,165 mol/L (CLSI, 2002)

Composição:

RPMI 1640 (Gibco BRL)	10,4 g
Tampão MOPS (USB)	34,5 g
D-Glicose (Nuclear)	18 g
Água destilada	1000 mL

Preparação:

O tampão MOPS (ácido morfolino-propanossulfônico) foi dissolvido em 900 mL de água destilada com agitação constante. A seguir, foram acrescentados a glicose e o RPMI 1640 e o pH ajustado a $7,0 \pm 0,1$, à temperatura ambiente, utilizando hidróxido de sódio 1 molar. A seguir, o volume foi completado e o meio foi esterilizado por filtração à vácuo com membrana Millipore de 0,22 micras.

3.3.3 Ágar RPMI 1640

A

Composição:

RPMI 1640 (Gibco BRL)	10,4 g
Tampão MOPS (USB)	34,5g
D-Glicose (Nuclear)	18 g
Água destilada	500 mL

Preparação:

O tampão MOPS (ácido morfolino-propanossulfônico) foi dissolvido em 450 mL de água destilada com agitação constante. A seguir, foram acrescentados a glicose e o RPMI 1640 e o pH ajustado a $7,0 \pm 0,1$, à temperatura ambiente, utilizando hidróxido de sódio 1 molar. A seguir, o volume foi completado e o meio esterilizado por filtração à vácuo com membrana Millipore de 0,22 micras.

B

Composição:

Ágar bacteriológico (Difco)	12 g
Água destilada	500 mL

Preparação:

O ágar foi misturado em 500mL de água destilada e o meio esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento a aproximadamente 60°C, o meio foi homogeneizado com o respectivo componente A, e a seguir distribuídos volumes de aproximadamente 40 mL em placas de Petri de 30 x 150 mm.

3.3.4 Mueller-Hinton

Composição:

Mueller-Hinton (Difco)	21g
Água destilada	1000 mL

Preparação:

O Mueller-Hinton foi misturado em 1000mL de água destilada em balão e o meio esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.3.5 Ágar Mueller-Hinton

Composição:

Mueller-Hinton (Difco)	21g
Ágar bacteriológico (Difco)	18 g
Água destilada	1000 mL

Preparação:

O Muller-Hinton e o ágar foram misturados em 1000 mL de água destilada e o meio esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento a aproximadamente 60°C, foram distribuídos aproximadamente 40 mL em placas de Petri de 30 x 150 mm.

3.4 Suspensão inicial do inóculo

As amostras de levedura foram cultivadas em tubos de ágar Sabouraud dextrose (ASD) e incubadas à temperatura de 37°C, durante 24 horas. A suspensão inicial do inóculo foi preparada em solução salina 0,85% (previamente esterilizada), de modo que se obtivesse uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland. A seguir, as leveduras foram quantificadas em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado para $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ UFC/mL. A concentração, viabilidade e a pureza do inóculo foram avaliadas por semeadura de 100 µL da suspensão pelo método de inundação em placas de ASD. Após a incubação a 37°C por 48 horas, foram quantificadas as UFC/mL e observada a pureza dos cultivos.

3.5 MICRODILUIÇÃO EM CALDO (NCCLS, 1997)

Os anti-sépticos foram diluídos da seguinte forma:

Foram distribuídos volumes de 1 mL do respectivo meio de cultura, RPMI 1640 ou Mueller-Hinton, nos tubos de número 2, 3, e 4 e 1,6 mL no tubo de número 1. A seguir, foi adicionado o volume de 400 µL do anti-séptico no tubo de número 1. Após agitação manual, foi realizada a diluição seriada (V/V) à partir do tubo número 1, de forma que as concentrações finais de anti-séptico variassem de 20% a 2,5%, conforme ilustra a figura 1.

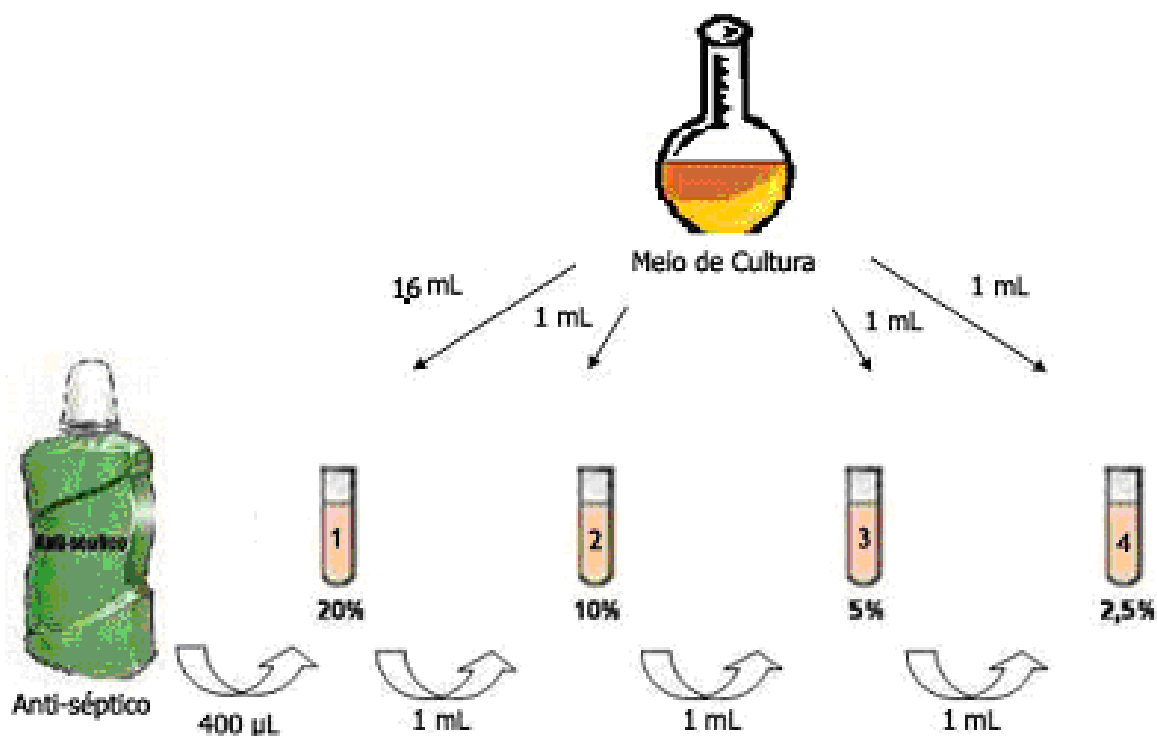


Figura 1. Fluxograma da diluição dos anti-sépticos bucais para microdiluição em caldo.

A seguir, os anti-sépticos foram distribuídos nas placas de microdiluição da seguinte forma:

Para as concentrações finais de 100% e 50% um volume de 100 μ L do anti-séptico puro (100%) foi adicionado, respectivamente, aos poços número 1 e 2. Para as demais concentrações, volumes de 100 μ L do anti-séptico nas concentrações 20%, 10%, 5% e 2,5% foram dispensadas em seqüência nos poços de número 3 a 6 das placas de microdiluição (Figura 2).

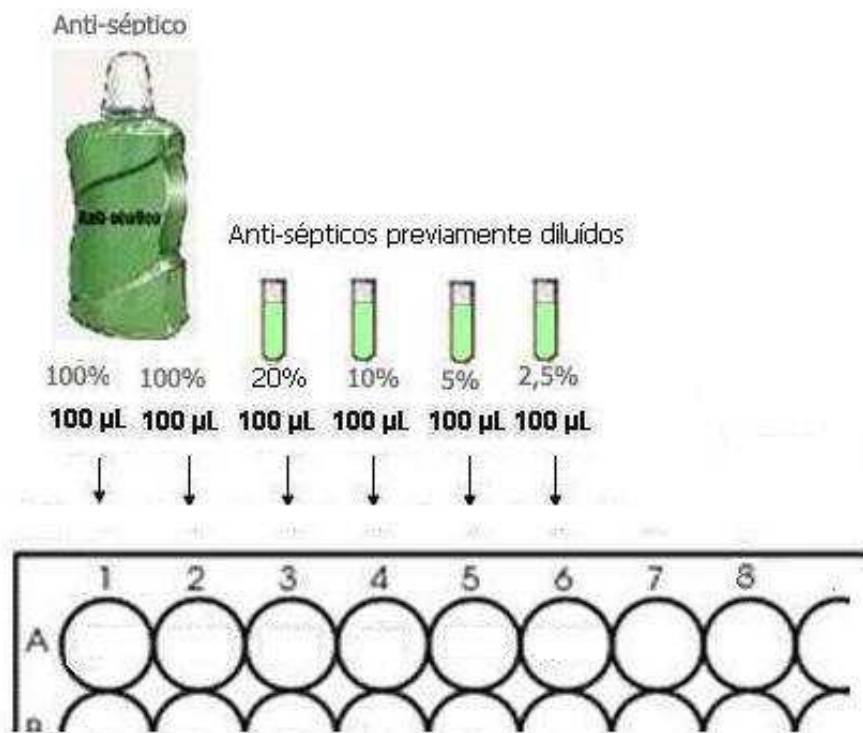


Figura 2. Fluxograma da distribuição dos anti-sépticos bucais para microdiluição em caldo

A seguir, foram preparadas as soluções dos inóculos e distribuídas nos respectivos poços da seguinte forma:

O inóculo inicial de $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ UFC/mL (item 3.4) foi diluído 1:1000 (1:50 e 1:20) em anti-séptico puro e em meio de cultura RPMI 1640 ou Mueller-Hinton, obtendo-se aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^3$ UFC/mL. A seguir, 100 μ L da diluição em anti-séptico foram inoculados no poço número 1 e 100 μ L da diluição em meio de cultura nos poços de número 2 a 6 (Figura 3).

Como controle positivo, foram dispensados 200 μ L da suspensão do inóculo no respectivo meio de cultura no poço número 7 e como controle negativo, 200 μ L do meio de cultura no poço número 8. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas (Figura 3). Para melhor visualização, as placas foram colocadas em um suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do reverso das mesmas. A menor porcentagem (concentração de anti-séptico) capaz de inibir o crescimento da levedura foi considerada como concentração inibitória mínima - CIM.

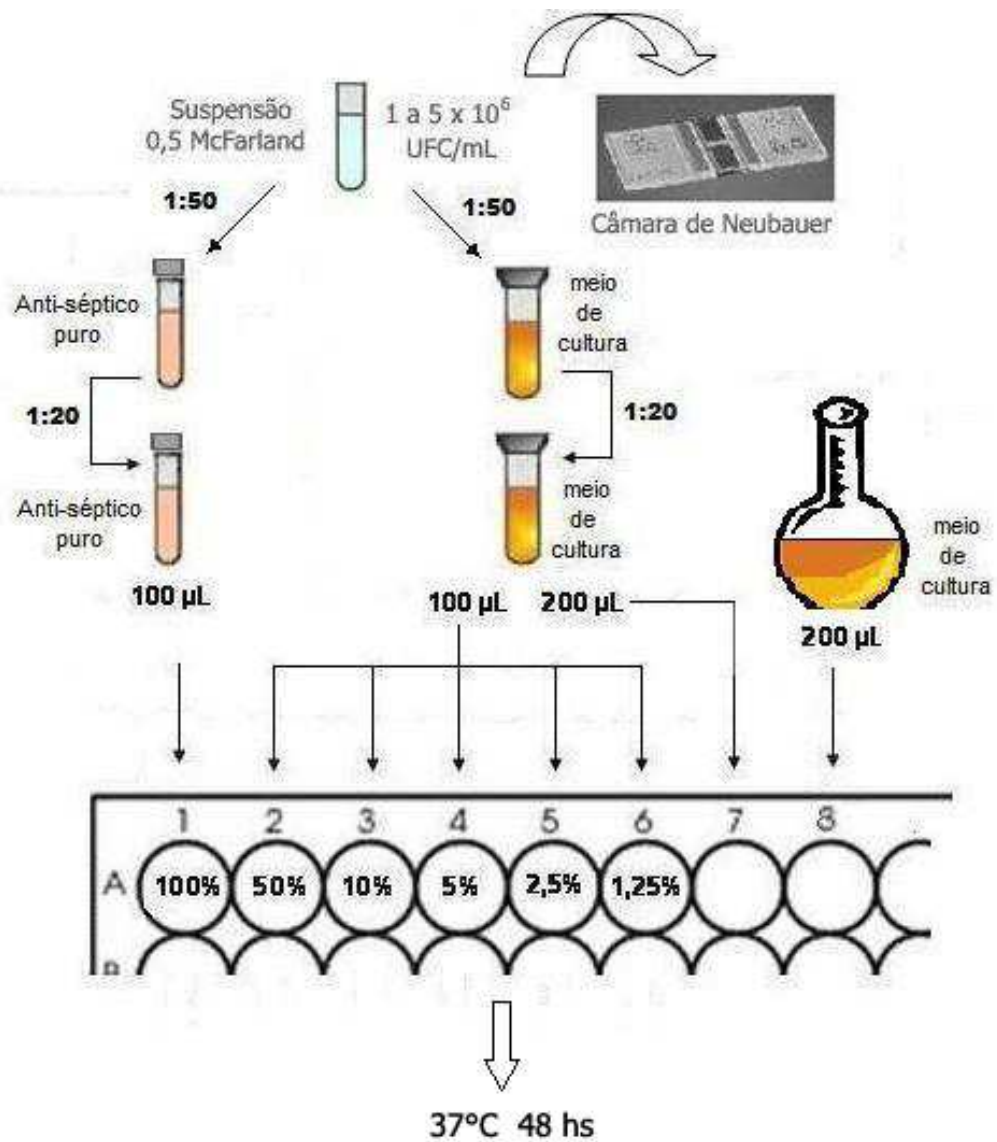


Figura 3. Fluxograma da distribuição do inóculo e incubação para microdiluição em caldo.

3.6 MACRODILUIÇÃO EM CALDO (NCCLS, 1997)

Os anti-sépticos foram diluídos da seguinte forma:

Foram distribuídos volumes de 1 mL do respectivo meio de cultura, RPMI 1640 ou Mueller-Hinton, nos tubos de número 1, 2 e 3. A seguir, foi adicionado o volume de 1 mL do anti-séptico no tubo de número 1. Após agitação manual, foi realizada a diluição seriada (V/V) à partir do tubo número 1, de forma que as concentrações finais de anti-séptico variassem de 50% a 12,5%, conforme ilustra a figura 4.

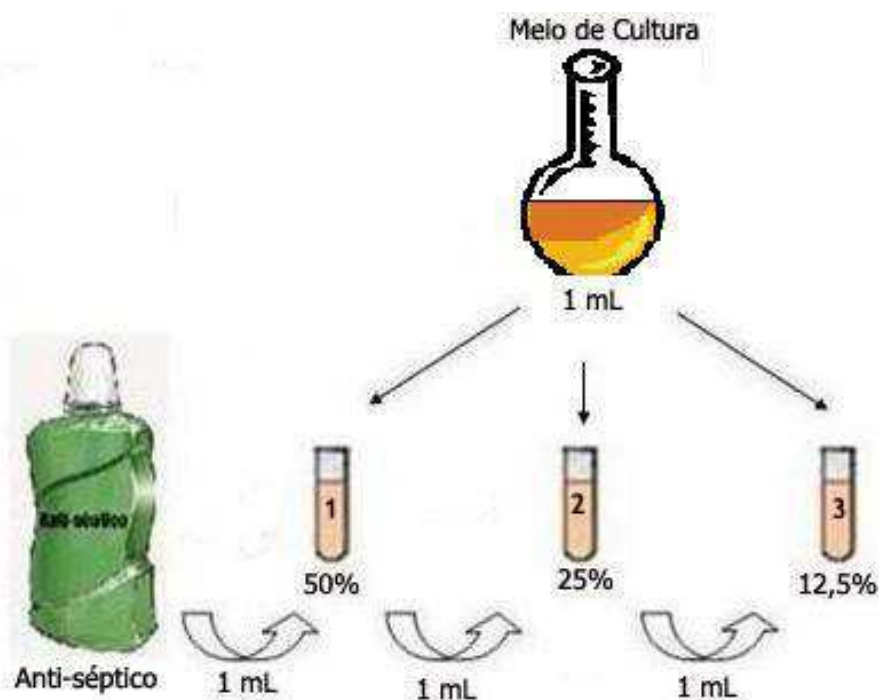


Figura 4. Fluxograma da diluição dos anti-sépticos bucais para macrodiluição em caldo.

A seguir, volumes de 100 μL dos anti-sépticos puros foram dispensados nos tubos de número 1 e 3 e volume de 72,5 μL no tubo de número 2. Volumes de 100 μL dos anti-sépticos previamente diluídos nas concentrações de 50%, 25% e 12,5% foram dispensados respectivamente nos tubos de número 4, 5 e 6 (Figura 5).

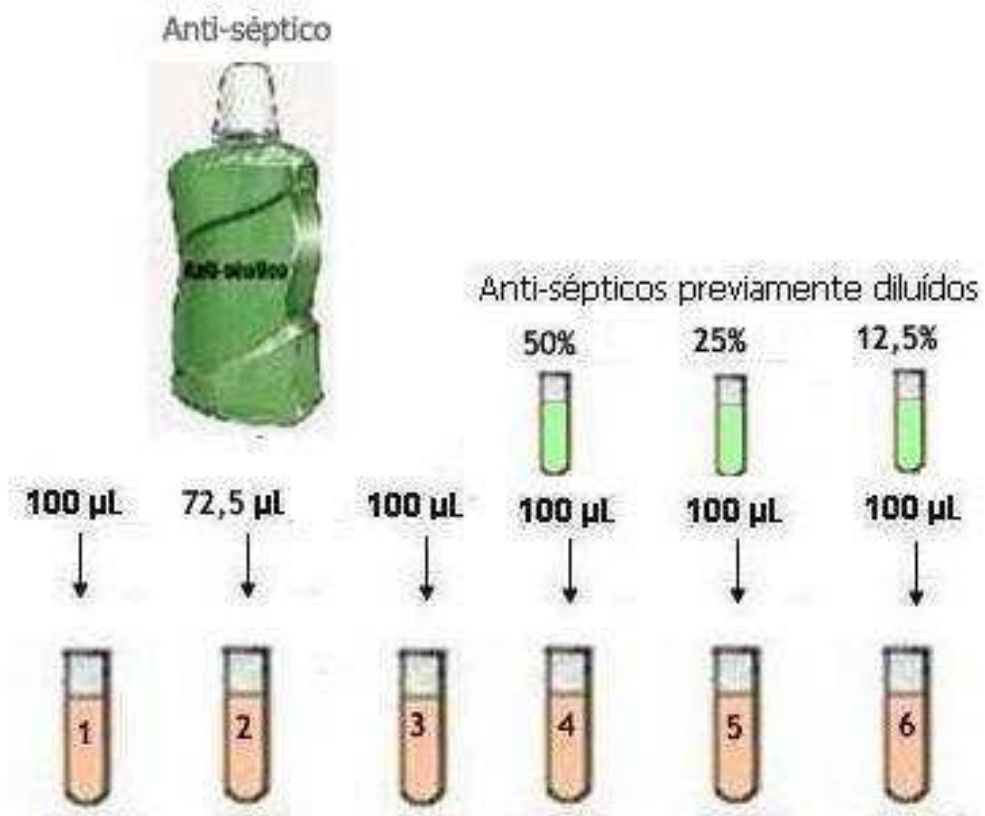


Figura 5. Fluxograma da distribuição dos anti-sépticos bucais para macrodiluição em caldo

A seguir, foram preparadas e dispensadas as suspensões de inóculo da seguinte forma:

O inóculo inicial de 1 a 5×10^6 UFC/mL (item 3.4) foi diluído na proporção 1:100 em anti-séptico puro e nos respectivos meios de cultura RPMI 1640 e Mueller-Hinton, seguida da diluição de 1:20 em anti-séptico puro; solução meio de cultura e anti-séptico puro (V/V); e em meio de cultura.

A seguir, volumes de 900 μ L foram distribuídos nos respectivos tubos de número 1 a 7 como ilustra a figura 6. A seguir, foram distribuídos os respectivos meios de cultura em volumes de 27,5 μ L no tubo de número 2, 100 μ L no tubo de número 7 e 1000 μ L no tubo de número 8, de forma que todos os tubos (1 a 8) tivessem o mesmo volume final (1000 μ L) e anti-sépticos nas concentrações finais de 100% a 1,25%. Os tubos de número 7 e 8 representam os controles positivos (de crescimento) e negativos.

Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas. A seguir, foi observado o crescimento ou inibição do microrganismo nos tubos referentes às diferentes concentrações avaliadas. A menor porcentagem (menor concentração de anti-séptico) capaz de inibir o crescimento da levedura foi considerada CIM.

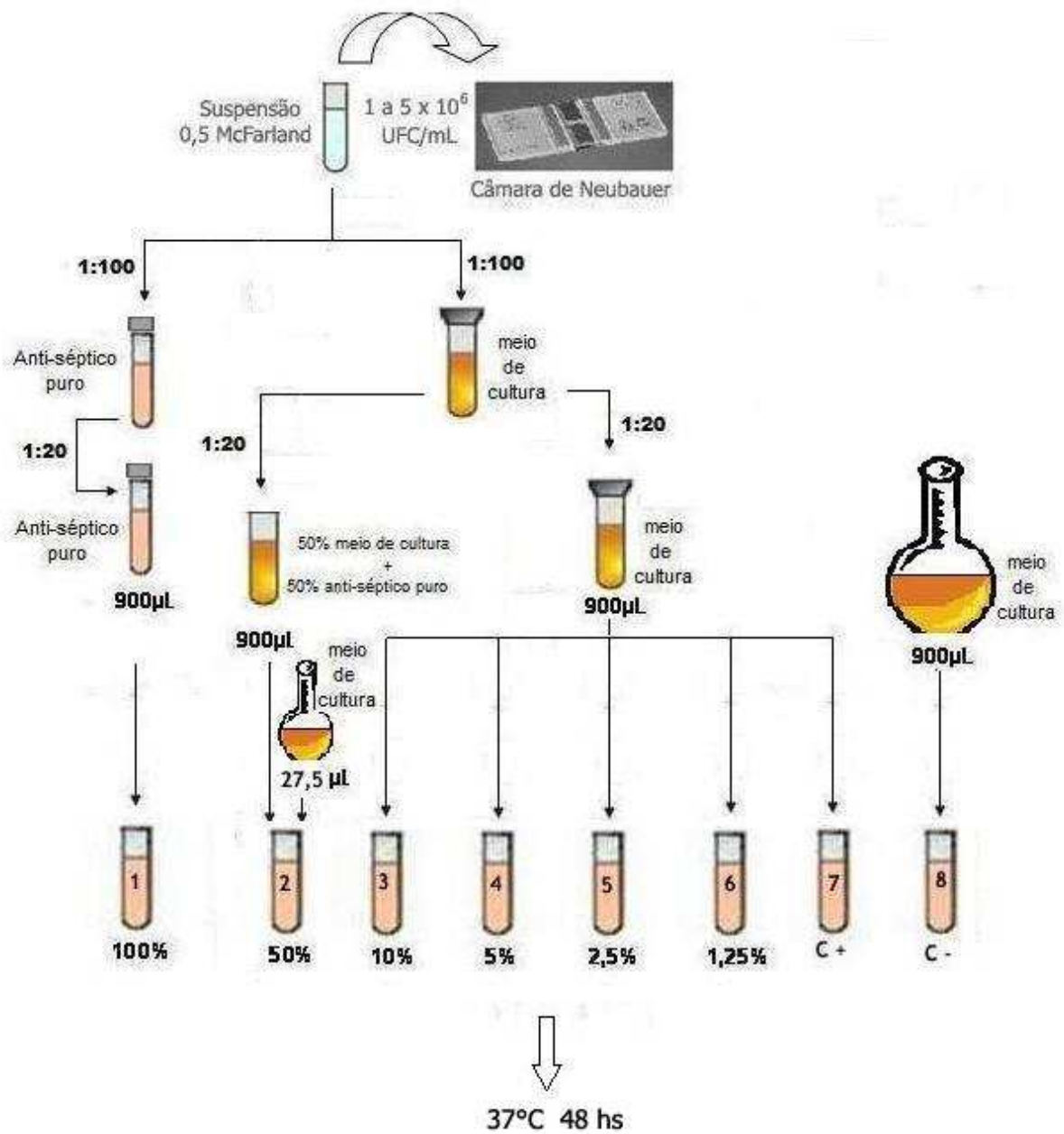


Figura 6. Fluxograma da distribuição do inóculo para microdiluição em caldo.

3.7 DIFUSÃO EM ÁGAR

Os anti-sépticos foram diluídos da seguinte forma:

Foram distribuídos volumes de 1 mL do respectivo meio de cultura, RPMI 1640 ou Mueller-Hinton, nos tubos de número 1, 3, 4, e 5 e 1,8 mL no tubo de número 2. A seguir, foi adicionado o volume de 1 mL do anti-séptico no tubo de número 1 e 200 μ L no tubo de número 2. Após agitação manual, foi realizada a diluição seriada (V/V) a partir do tubo número 2, de forma que as concentrações finais de anti-séptico variassem de 50% a 1,25%, conforme ilustra a figura 7.

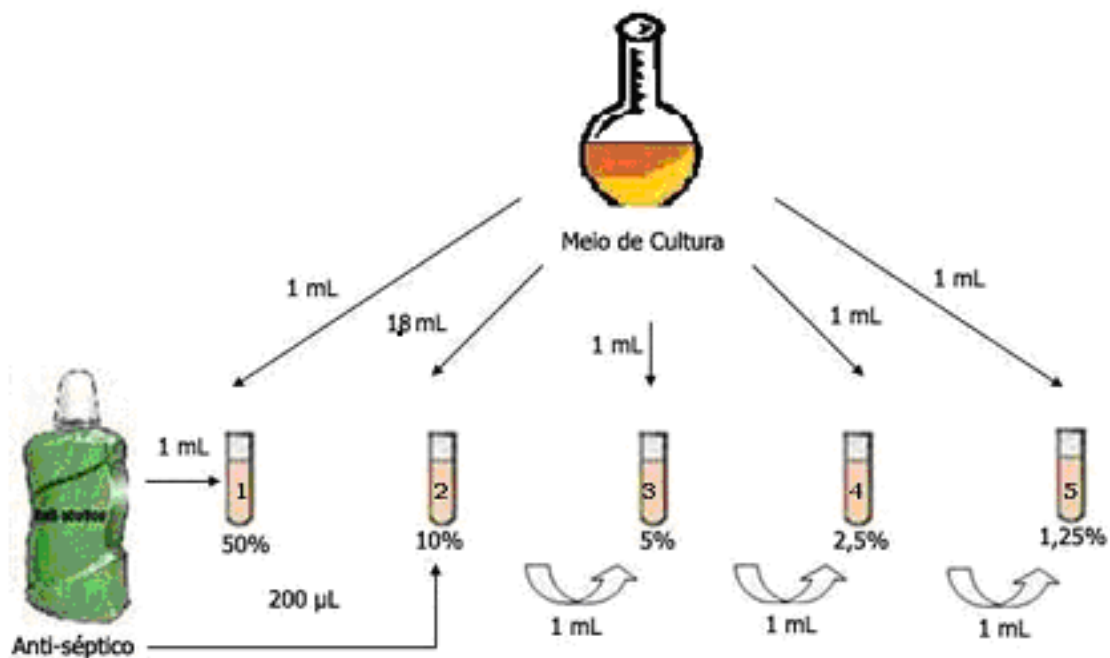


Figura 7. Fluxograma da diluição dos anti-sépticos bucais para difusão em ágar.

A seguir, as placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura, Ágar RPMI 1640 e Ágar Mueller-Hinton, foram inoculadas com 1 mL da suspensão inicial de inóculo contendo 1 a 5×10^6 UFC/mL (item 3.4).

Após inundação, foi retirado o excesso com auxílio da pipeta. As placas ficaram entreabertas em câmara de fluxo laminar até apresentarem superfície seca. A seguir foram confeccionados poços/orifícios de 6,0 mm de diâmetro em pontos eqüidistantes (cerca de 20 poços por placa), com o auxílio da parte posterior de uma ponteira de pipeta de 10 -100 μ L. Foram colocados em cada orifício 20 μ L da diluição do respectivo anti-séptico e do controle negativo cetoconazol na concentração 80 μ g/mL (Figura 8).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A seguir, foram mensurados o diâmetro dos halos inibição (ausência de crescimento) com o auxílio de régua e o resultado foi expresso por milímetros da zona de inibição da respectiva concentração do anti-séptico.

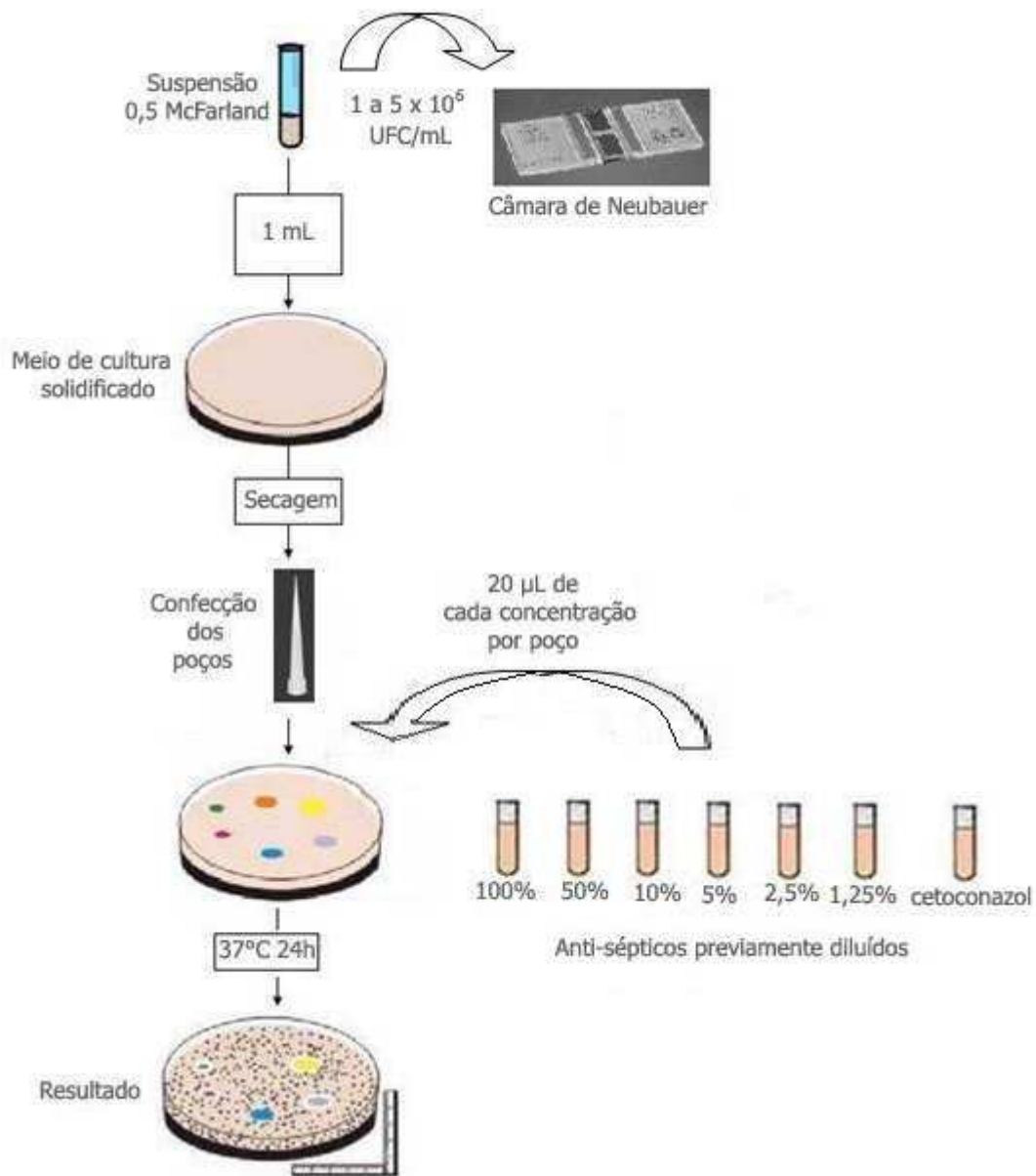


Figura 8. Fluxograma do teste de suscetibilidade de *Candida* a anti-sépticos bucais para difusão em ágar.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA – CFM

MICRO E MACRODILUIÇÃO

Após a leitura da CIM, os tubos e as placas foram agitados e a seguir foram retirados com auxílio de pipeta automática pequenos volumes que foram semeados em forma de gota na superfície de placa de ágar Sabouraud dextrose. Após incubação a 37°C por 24 horas foi considerada como CFM a menor concentração capaz de matar a levedura.

3.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para o cálculo do grau de concordância entre os meios e as metodologias macro e microdiluição, foi utilizado o teste *kappa* além da concordância absoluta em porcentagem. A concordância através de *kappa* foi considerada excelente quando *kappa* foi igual ou maior a 0,75; boa entre 0,41 e 0,74; e pobre menor que 0,40 (LANDS & KOCH, 1977).

Para o cálculo do grau de concordância entre os meios de cultura na metodologia de difusão em ágar, foi utilizado o coeficiente de correlação de concordância (CCC). CCCs próximos a 1,0 indicam grau de concordância elevado e próximos de 0, baixo grau de concordância (LIN, 1989).

Foram consideradas iguais uma diluição acima ou abaixo na série.

4. Resultados

4.1 Valores de CIM obtidos pela macro e microdiluição em caldo

4.1.1 *Candida albicans* ATCC 64548

O teste da suscetibilidade de *C. albicans* ATCC 64548 pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo revelou que o anti-séptico bucal Listerine® apresentou CIM de 5% na microdiluição com ambos os meios de cultura e de 50% e 10% na macrodiluição, respectivamente nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton. Malvatricin® apresentou CIM de 10% na macrodiluição com ambos os meios de cultura e na microdiluição de 50% com o meio de RPMI 1640 e 10% com Mueller-Hinton. Reach® apresentou CIM variando de 1,25% a 50%. E para Noplak®, Oral B®, Periogard® e Plax® a CIM de 1,25% foi comum em ambas as metodologias e meios de cultura (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a *C. albicans* ATCC 64548 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

CIM (%) Anti-séptico	Microdiluição		Macrodiluição	
	RPMI 1640	Mueller-Hinton	RPMI 1640	Mueller-Hinton
Listerine	5	5	50	10
Malvatricin	50	10	10	10
Noplak	1,25	1,25	1,25	1,25
Oral B	1,25	1,25	1,25	1,25
Periogard	1,25	1,25	1,25	1,25
Plax	1,25	1,25	1,25	1,25
Reach	2,5	1,25	10	50

4.1.2 *Candida glabrata* ATCC 90030

O teste da suscetibilidade de *C. glabrata* ATCC 90030 pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo revelou que os anti-sépticos bucais Listerine[®] e Malvatricin[®] apresentaram mesmo valor de CIM (5%) em ambos os meios de cultura na metodologia da microdiluição e concentrações maiores de CIM na metodologia da macrodiluição. Noplak[®], Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®] apresentaram CIM de 1,25% em ambas as metodologias e meios de cultura (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a *C. glabrata* ATCC 90030 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

CIM (%) Anti-séptico	Microdiluição		Macrodiluição	
	RPMI 1640	Mueller-Hinton	RPMI 1640	Mueller-Hinton
Listerine	5	5	50	10
Malvatricin	5	5	10	10
Noplak	1,25	1,25	1,25	1,25
Oral B	1,25	2,5	1,25	1,25
Periogard	1,25	1,25	1,25	1,25
Plax	1,25	1,25	1,25	1,25
Reach	1,25	1,25	1,25	1,25

4.1.3 *Candida krusei* ATCC 6258

O teste da suscetibilidade de *C. krusei* ATCC 6258 pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo revelou que o anti-séptico bucal Listerine[®] apresentou CIM de 5% para a microdiluição em ambos os meios de cultura e na macrodiluição com os meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton, respectivamente CIMs de 50% e 10%. Malvatricin[®] apresentou CIM de 10% na microdiluição em RPMI 1640 e 5% em Mueller-Hinton e de 10% na macrodiluição para ambos os meios de cultura. Noplak[®], Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®] apresentaram CIM de 1,25% em ambas as metodologias e meios de cultura (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a *C. krusei* ATCC 6258 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

CIM (%) Anti-séptico	Microdiluição		Macrodiluição	
	RPMI 1640	Mueller-Hinton	RPMI 1640	Mueller-Hinton
Listerine	5	5	50	10
Malvatricin	10	5	10	10
Noplak	1,25	1,25	1,25	1,25
Oral B	1,25	1,25	1,25	1,25
Periogard	1,25	1,25	1,25	1,25
Plax	1,25	1,25	1,25	1,25
Reach	1,25	1,25	1,25	1,25

4.1.4 *Candida parapsilosis* ATCC 22019

O teste da suscetibilidade de *C. parapsilosis* ATCC 22019 pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo revelou que o anti-séptico bucal Listerine® apresentou CIM de 5%, exceto no meio RPMI 1640 da macrodiluição onde o CIM foi de 50%. Malvatricin® apresentou CIM de 10% no meio RPMI 1640 e de 5% no meio Mueller-Hinton para ambas as metodologias. Oral B® e Periogard® apresentaram CIM de 1,25% em ambas as metodologias e meios de cultura. Noplak® e Plax® também apresentaram CIM de 1,25%, exceto para o meio de RPMI 1640 para a microdiluição de Noplak® e macrodiluição de Plax® onde o CIM foi de 2,5%. Reach® apresentou CIM de 10% na microdiluição e de 50% na macrodiluição para ambos os meios de cultura (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a *C. parapsilosis* ATCC 22019 avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

CIM (%) Anti-séptico	Microdiluição		Macrodiluição	
	RPMI 1640	Mueller-Hinton	RPMI 1640	Mueller-Hinton
Listerine	5	5	50	5
Malvatricin	10	5	10	5
Noplak	2,5	1,25	1,25	1,25
Oral B	1,25	1,25	1,25	1,25
Periogard	1,25	1,25	1,25	1,25
Plax	1,25	1,25	2,5	1,25
Reach	10	10	50	50

4.1.5 *Candida tropicalis* ATCC 750

O teste da suscetibilidade de *C. tropicalis* ATCC 750 pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo revelou que o anti-séptico bucal Listerine® apresentou CIM de 5% para a microdiluição em ambos os meios de cultura e na macrodiluição, CIM de 50% com o meio RPMI 1640 e 10% com Mueller-Hinton. Malvatricin® apresentou CIM de 10% exceto na microdiluição com o meio Mueller-Hinton onde o CIM foi de 5%. Noplak®, Oral B®, Periogard®, Plax® e Reach® apresentaram CIM de 1,25% em ambas as metodologias e meios de cultura (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) para suscetibilidade de *C. tropicalis* ATCC 750 frente a sete anti-sépticos bucais avaliada pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

CIM (%) Anti-séptico	Microdiluição		Macrodiluição	
	RPMI 1640	Mueller-Hinton	RPMI 1640	Mueller-Hinton
Listerine	5	5	50	10
Malvatricin	10	5	10	10
Noplak	1,25	1,25	1,25	1,25
Oral B	1,25	1,25	1,25	1,25
Periogard	1,25	1,25	1,25	1,25
Plax	1,25	1,25	1,25	1,25
Reach	1,25	1,25	1,25	1,25

4.2 Halos de inibição obtidos pela difusão em ágar

4.2.1 *Candida albicans* ATCC 64548

O teste da suscetibilidade de *C. albicans* ATCC 64548 pelo método da difusão em ágar revelou que os anti-sépticos bucais Listerine® e Malvatricin® não apresentaram ação inibitória em nenhum dos meios de cultura para nenhuma das concentrações de anti-séptico. Noplak®, Oral B® e Periogard® apresentaram halos de inibição com diâmetros variando de 11 a 15 mm somente quando puros (100%) em ambos os meios de cultura, enquanto Plax® apresentou halo de 9 mm na concentração de 50% no meio de Mueller-Hinton e Reach® apresentou halo de 11 mm nas concentrações de 10% e 50% no meio RPMI 1640 (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a *C.albicans* ATCC 64548, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Halos (mm) Concentração	Anti-sépticos bucais													
	Listerine		Malvatricin		Noplak		Oral B		Periogard		Plax		Reach	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
100	0	0	0	0	13	12	12	15	15	14	16	13	11	11
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: RPMI- 1640; M: Mueller-Hinton

4.2.2 *Candida glabrata* ATCC 90030

O teste da suscetibilidade de *C. glabrata* ATCC 90030 pelo método da difusão em ágar revelou que os anti-sépticos bucais Listerine® e Malvatricin® não apresentaram ação inibitória. Enquanto Noplak® e Oral B® apresentaram halos de inibição variando de 11 a 21 mm até na concentração de 10%. Periogard® e Plax® apresentaram halos de inibição com diâmetros variando de 9 a 11 mm somente quando puros (100%) em ambos os meios de cultura. Reach® apresentou halos variando de 12 a 15 mm até na concentração de 50% (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a *C.glabrata* ATCC 90030, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Halos (mm) Concentração	Anti-sépticos bucais													
	Listerine		Malvatricin		Noplak		Oral B		Periogard		Plax		Reach	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
100	0	0	0	0	21	19	18	14	9	9	11	10	15	15
50	0	0	0	0	17	15	16	11	0	0	0	0	13	12
10	0	0	0	0	11	12	12	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: RPMI- 1640; M: Mueller-Hinton

4.2.3 *Candida krusei* ATCC 6258

O teste da suscetibilidade de *C. krusei* ATCC 6258 pelo método da difusão em ágar revelou que os anti-sépticos bucais Listerine[®] e Malvatricin[®] não apresentaram ação inibitória. Noplak[®], Plax[®] e Reach[®] apresentaram halos de inibição variando de 9 a 20 mm até na concentração de 10% em pelo menos um meio de cultura. Oral B[®] e Periogard[®] apresentaram halos de inibição com diâmetros variando de 9 a 18 mm até na concentração de 50% em pelo menos um meio de cultura (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a *C.krusei* ATCC 6258, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Halos (mm) Concentração	Anti-sépticos bucais													
	Listerine		Malvatricin		Noplak		Oral B		Periogard		Plax		Reach	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
100	0	0	0	0	20	18	15	14	18	15	20	16	18	14
50	0	0	0	0	16	10	9	9	17	0	18	13	13	10
10	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	12	11	9	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: RPMI- 1640; M: Mueller-Hinton

4.2.4 *Candida parapsilosis* ATCC 22019

O teste da suscetibilidade de *C. parapsilosis* ATCC 22019 pelo método da difusão em ágar revelou que os anti-sépticos bucais Listerine® e Malvatricin® não apresentaram ação inibitória em nenhum dos meios de cultura para nenhuma das concentrações de anti-séptico. Noplak® e Periogard® apresentaram halos de inibição variando de 11 a 24 mm até na concentração de 10%. Oral B® e Reach® apresentaram halos de inibição com diâmetros variando de 10 a 18 mm até na concentração de 50%. Plax® só apresentou halos de inibição quando puro (100%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a *C.parapsilosis* ATCC 22019, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Halos (mm) Concentração	Anti-sépticos bucais													
	Listerine		Malvatricin		Noplak		Oral B		Periogard		Plax		Reach	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
100	0	0	0	0	22	18	18	15	24	22	19	17	14	14
50	0	0	0	0	16	16	12	10	15	15	0	0	10	10
10	0	0	0	0	12	11	0	0	12	13	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: RPMI- 1640; M: Mueller-Hinton

4.2.5 *Candida tropicalis* ATCC 750

O teste da suscetibilidade de *C. tropicalis* ATCC 750 pelo método da difusão em ágar revelou que os anti-sépticos bucais Listerine® e Malvatricin® não apresentaram ação. Noplak®, Oral B® e Reach® apresentaram halos de inibição com diâmetros variando de 13 a 21 mm até na concentração de 10%. Periogard® e Plax® apresentaram halos de inibição somente quando puros (100%) em ambos os meios de cultura (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores dos halos de inibição de sete anti-sépticos bucais, frente a *C.tropicalis* ATCC 750, avaliados pelo método de difusão nos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Halos (mm) Concentração	Anti-sépticos bucais													
	Listerine		Malvatricin		Noplak		Oral B		Periogard		Plax		Reach	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M
100	0	0	0	0	20	21	20	20	20	18	18	21	20	20
50	0	0	0	0	15	18	17	19	0	0	0	0	19	20
10	0	0	0	0	13	15	15	16	0	0	0	0	18	18
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: RPMI- 1640; M: Mueller-Hinton

4.3 Coeficiente *kappa*

4.3.1 Comparação entre os meios de cultura na micro e macrodiluição

Comparando-se os valores de CIM obtidos com a utilização dos meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton para cada metodologia através do cálculo do coeficiente *kappa*, foi obtido valor 1,00 para todas as cepas testadas em ambas as metodologias exceto para a cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 que obteve valor de *kappa* igual a 0,73 na metodologia da macrodiluição em caldo.

Os valores de concordância absoluta estão expressos em porcentagem e assim como o coeficiente *kappa* apresentam na grande maioria o valor 100 (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de coeficiente *kappa* e da concordância absoluta (%) da comparação entre os meios de cultura utilizados nas metodologias de micro e macrodiluição em caldo.

Cepas	Microdiluição		Macrodiluição	
	<i>kappa</i>	concordância %	<i>kappa</i>	concordância %
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	1,00	100	1,00	100
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	1,00	100	1,00	100
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1,00	100	1,00	100
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1,00	100	0,73	86
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1,00	100	1,00	100

4.3.2 Comparação entre as metodologias micro e macrodiluição em caldo

Comparando-se os valores de CIM obtidos com as metodologias da micro e macrodiluição para cada meio de cultura através do cálculo do coeficiente *kappa*, foi obtido valor 1,00 para todas as cepas testadas no meio Mueller-Hinton, exceto a cepa de *C. albicans* ATCC 64548 que obteve coeficiente 0,71. Quando analisada a concordância entre as metodologias no meio RPMI 1640, o coeficiente *kappa* foi variável, obtendo menor valor também com a cepa de *C. albicans* ATCC 64548.

Os valores de concordância absoluta estão expressos em porcentagem e assim como o coeficiente *kappa* apresentaram valores mais baixos para a cepa de *C. albicans* ATCC 64548 (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de coeficiente *kappa* e da concordância absoluta (%) da comparação entre as metodologias com meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Cepas	RPMI 1640		Mueller-Hinton	
	<i>kappa</i>	concordância %	<i>kappa</i>	concordância %
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	0,42	71	0,71	86
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	0,68	86	1,00	100
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,67	86	1,00	100
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,72	86	1,00	100
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,67	86	1,00	100

4.4 Coeficiente de correlação de concordância (CCC)

Para a análise de concordância entre os meios de cultura utilizados na metodologia da difusão em ágar, foi calculado o CCC utilizando-se a medida dos halos de inibição apresentados pelos anti-sépticos bucais quando puros (100%). Os valores de CCC variaram muito pouco, de 0,95 para a cepa de *C. krusei* ATCC 6258 a 0,99 para a cepa de *C. tropicalis* ATCC 750 (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de CCC da comparação entre os meios de cultura RPMI 1640 e Mueller- Hinton na difusão em ágar.

Cepa	CCC
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	0,96
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	0,97
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,95
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,97
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,99

4.5 Ação inibitória (CIM) e fungicida (CFM) dos sete anti-sépticos bucais nas metodologias macro e microdiluição

De acordo com os resultados previamente demonstrados, verificamos que ambas as metodologias de diluição e ambos os meios avaliados fornecem resultados muito correlacionados. Desta forma, para inferir sobre a ação inibitória e fungicida dos anti-sépticos, optamos pelos resultados obtidos em ambas as metodologias com o meio RPMI 1640.

A tabela 14 demonstra que os anti-sépticos bucais Noplak[®], Oral B[®], Periogard[®] e Plax[®] apresentaram ações inibitórias (CIM) e fungicidas (CFM) variando de 1,25% a 2,5%. Reach[®], variando de 1,25% a 50%. Listerine[®] de 5% a 50% e Malvatricin[®] de 5% a 100% .

Tabela 14- Intervalo de valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para suscetibilidade de sete anti-sépticos bucais frente a *Candida* sp avaliadas pelos métodos de micro e macrodiluição em caldo no meio RPMI 1640.

Anti-séptico	Microdiluição		Macrodiluição	
	CIM	CFM	CIM	CFM
	Intervalo (%)		Intervalo (%)	
Listerine	5	5	50	50
Malvatricin	5 - 50	10 -100	10	10 -100
Noplak	1,25	1,25 - 2,5	1,25	1,25 - 2,5
Oral B	1,25	1,25	1,25	1,25
Periogard	1,25	1,25	1,25	1,25
Plax	1,25	1,25	1,25 - 2,5	1,25 - 2,5
Reach	1,25 - 10	1,25 -10	1,25 - 50	1,25 - 50

5. Discussão

O meio de cultura considerado ideal para testes de suscetibilidade é aquele altamente disponível, econômico, bem padronizado, que proporciona o rápido crescimento dos microrganismos, apropriado para todos os agentes antifúngicos, com pH estável e que não contém substâncias que alteram a atividade antifúngica das drogas avaliadas (RADETSKY *et al.*, 1986).

Com o intuito de analisar qual meio seria mais adequado para a realização de testes de suscetibilidade com anti-sépticos bucais, realizamos micro e macrodiluição em caldo e difusão em ágar utilizando os meios RPMI 1640 e Mueller-Hinton.

Observamos que durante a execução dos experimentos e na leitura dos resultados os meios de cultura se comportaram de maneira semelhante. Ambos não interferiram na visualização do crescimento da levedura nos tubos da macrodiluição e poços da microdiluição, assim como não houve qualquer tipo de reação entre os meios de cultura e os anti-sépticos avaliados que produzissem alterações visíveis ou dificultassem a interpretação dos resultados. Na metodologia da difusão em ágar, ambos proporcionaram o crescimento homogêneo da levedura por toda a superfície da placa e produziram halos de inibição claros, sem crescimento de colônias em seu interior.

De modo geral, não observamos diferenças entre as CIMs para cada meio de cultura considerando uma metodologia. Quando houve alguma diferença, ela foi na maioria dos casos de apenas uma diluição e o meio Mueller-Hinton foi capaz de detectar a ação dos anti-sépticos em menor concentração. Este fato foi observado nos resultados obtidos com o Listerine[®] na metodologia da macrodiluição, Malvatricin[®] na macro e microdiluição. No caso do Reach[®], a discrepância relevante foi no meio RPMI 1640 que detectou menor concentração na macrodiluição com *C. albicans* ATCC 64548. Acreditamos que estas diferenças estejam relacionadas com a amostragem pequena.

Na difusão em ágar, observamos que quando os anti-sépticos estavam na concentração máxima (100%), o diâmetro dos halos apresentados em ambos os meios de cultura foram semelhantes, independente da cepa e dos anti-sépticos

avaliados. Ressaltando que Listerine[®] e Malvatricin[®] não apresentaram ação inibitória por esta metodologia em nenhum meio quando puros. Os demais anti-sépticos quando diluídos apresentaram resultados divergentes na comparação dos meios de cultura. Verificamos que este fato ocorreu com *C. albicans* ATCC 64548, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. krusei* ATCC 6258, onde foi observado halo de inibição em um meio e crescimento em outro meio, considerando a mesma cepa e mesmo anti-séptico. Por exemplo, o anti-séptico Plax[®] na concentração de 50% e Reach[®] nas concentrações de 50% e 10% frente à cepa de *C. albicans* ATCC 64548 (Tabela 6).

Apesar das pequenas diferenças encontradas na comparação dos meios de cultura, o coeficiente *kappa* que avaliou a concordância entre os CIMs obtidos com diferentes meios na macro e microdiluição em caldo, demonstrou valor de 1,00 para todas as cepas e anti-sépticos analisados na metodologia da microdiluição. Este resultado indica excelente concordância entre os meios de cultura utilizados. E na metodologia da macrodiluição em caldo, o coeficiente *kappa* foi de 1,00 (excelente) para a maioria das cepas, exceto para *C. parapsilosis* ATCC 22019 onde foi de 0,73, indicando neste caso boa concordância entre os meios de cultura.

Para a avaliação da concordância entre os resultados obtidos por cada meio de cultura na metodologia de difusão em ágar, foi utilizado o coeficiente de correlação de concordância (CCC) por se tratarem valores qualitativos.

Segundo Lin (1989), os valores de CCC variam de -1 a 1, o valor 1 representa concordância excelente enquanto o valor -1 discordância total entre as avaliações. Os valores de CCC obtidos na comparação dos meios de cultura na metodologia de difusão em ágar foram superiores a 0,95 para todas as 5 cepas analisadas (Tabela 13). Sendo assim, nossos resultados indicam excelente concordância entre os meios de cultura pelo método da difusão.

O meio Mueller-Hinton, padronizado por Kirby e Bauer, é de fácil acesso em laboratórios de bacteriologia, normalmente é utilizado na forma sólida na execução de testes de suscetibilidade por difusão em ágar onde demonstra grande

reprodutibilidade interlaboratorial de resultados (PFALLER *et al.*, 1998; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2007).

O método de referência do CLSI indica a utilização do meio de RPMI 1640 tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) a pH 7,0 como meio de cultura referencial na realização de macro e microdiluição em caldo. As vantagens na utilização deste meio são várias: sua disponibilidade no mercado como formulação pronta, economia, altíssimo controle de qualidade, definição química constante, facilidade no preparo, a possibilidade do uso de diferentes tampões e a presença do fenol red como indicador de pH (RADETSKY *et al.*, 1986; NCCLS, 1997).

Concluimos que ambos os meios avaliados são adequados para a realização de testes de suscetibilidade de anti-sépticos bucais frente a cepas do gênero *Candida* através das metodologias de macro e microdiluição em caldo e de difusão em ágar por meio de poços.

Nestas condições, a escolha de um dos meios fica a critério do laboratório que pode primar pelo custo, bem como pela disponibilidade de obtenção do respectivo meio de cultura.

O tempo de incubação (24 ou 48 horas) é relatado como um dos fatores que podem interferir nos valores de CIM. Pfaller e cols (1990) observaram que ao comparar os CIMs obtidos na macrodiluição em 24 horas de incubação apresentavam concordância com os CIMs obtidos com 48 horas de incubação, no entanto relataram que os CIMs obtidos com 48 horas eram maiores que os de 24 horas. Sewell e cols (1994) observaram que a maioria das cepas por eles avaliadas apresentava crescimento insuficiente com 24 horas de incubação, o que impossibilitou a leitura dos resultados neste tempo e que com 48 horas esta leitura foi possível e demonstrou CIMs mais elevados que os obtidos para as cepas que possibilitaram a leitura com 24 horas de incubação.

Em nosso protocolo, preconizamos a leitura dos resultados com 48 horas de incubação para a macro e microdiluição em caldo como é preconizado pelo CLSI,

mas em todas as ocasiões também foram efetuadas leituras com 24 horas (dados não relatados). Na maioria das vezes era observado crescimento insuficiente das leveduras nos poços e tubos controle, assim como relatou Sewell e cols (1994). Nas ocasiões em que era possível determinar um valor de CIM, este foi sempre menor do que o obtido em 48 horas como relatou Pfaller e cols (1990).

Em relação à comparação das metodologias, observamos que de forma geral, os anti-sépticos bucais Noplak[®], Oral B[®], Periogard[®] e Plax[®] apresentaram o mesmo valor de CIM na macro e microdiluição, independente da cepa e meio avaliados. Exceção foi observada com os anti-sépticos Listerine[®], Malvatricin[®] e ocasionalmente Reach[®] onde a microdiluição, na maioria dos casos, detectou inibição em menores concentrações de anti-séptico. Quanto ao Listerine[®] e Malvatricin[®] podemos inferir que as divergências entre as metodologias provavelmente foram devido às características físico-químicas destes.

O Listerine[®] entre todos os anti-sépticos bucais é o que contém maior quantidade de álcool, seus princípios ativos são os óleos essenciais eucaliptol, mentol e timol. O eucaliptol é obtido a partir da essência do eucalipto, é um líquido canforáceo de sabor picante que causa sensação de frescor devido a sua volatilidade, é quase insolúvel em água e é miscível em álcool. O mentol é um álcool obtido a partir da essência da hortelã, é quase insolúvel em água e muito solúvel em álcool. O timol é um fenol aromático de sabor picante, pouco solúvel em água e muito solúvel em álcool o que lhe confere volatilidade (FROTA, 1959). O princípio ativo do Malvatricin[®], o álcool xilitol, é um pó cristalino e sem odor que causa sensação de frescor quando em contato com epitélio devido a sua volatilidade (LIMA & BERLINCK, 2003).

Na macrodiluição, a superfície de contato do anti-séptico é maior e a vedação dos tubos foi feita com algodão, fatores que favorecem a evaporação dos princípios ativos voláteis, permitindo o crescimento do microrganismo e conseqüentemente elevando o valor de CIM. Na microdiluição o volume final da reação foi de 200µL que praticamente preencheram todo o poço e o sistema de vedação das placas também

pode ter ajudado na contenção da evaporação. Sendo assim, acreditamos que a volatilidade dos componentes de Listerine® e do Malvatricin® pôde contribuir para as pequenas divergências.

Apesar das pequenas discrepâncias entre as metodologias, a comparação delas pelo índice *kappa* demonstrou que quando utilizamos o meio Mueller-Hinton, o coeficiente foi de 1,00 para todas as cepas analisadas com exceção de *C. albicans* ATCC 6548 que obteve *kappa* 0,71. O que demonstra concordância excelente entre as metodologias de macro e microdiluição. Quando comparamos as metodologias pelos valores obtidos com o RPMI 1640, os valores de *kappa* variaram de 0,42 (*C. albicans* ATCC 64548) a 0,72 (*C. parapsilosis* ATCC22019) indicando uma boa concordância entre as metodologias.

Pelos dados gerais, observamos pequenas discrepâncias que ocorreram tanto na comparação dos meios quanto na comparação das metodologias. Elas sempre ocorreram com os mesmos anti-sépticos, principalmente Listerine® e mais raramente Malvatricin® e Reach®. Sendo assim, podemos inferir que dependendo do anti-séptico avaliado, podem ocorrer variações de CIM em relação aos meios e metodologias e que estas variações poderiam ser menos evidentes em uma amostragem maior de cepas incluindo isolados clínicos e intervalos menores de concentrações de anti-sépticos. Também sugerimos estudos em vários laboratórios para determinar a reprodutibilidade interlaboratorial destes métodos na avaliação dos anti-sépticos.

A literatura indica que as metodologias da macro e microdiluição em caldo geram resultados similares quando são avaliados antifúngicos frente a leveduras (ESPINNEL-INGROF *et al.*, 1991; BARCHIESI *et al.*, 1994; SEWELL *et al.*, 1994; TIBALLI *et al.*, 1995). Considerando que publicações similares avaliando as metodologias com anti-sépticos não são de nosso conhecimento, podemos concluir que assim como relatado para os antifúngicos, estas metodologias também podem ser utilizadas na avaliação de anti-sépticos bucais e gerar resultados semelhantes para a maioria dos anti-sépticos.

Observamos que somente os anti-sépticos (Noplak[®], Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®]) que apresentaram ação inibitória nas menores concentrações nas metodologias de diluição, apresentaram atividade inibitória na metodologia da difusão em ágar. Desta forma inferimos que a metodologia da difusão não deve ser utilizada nem mesmo para simples triagem, pois anti-sépticos voláteis tais como Listerine[®] e Malvatricin[®] que agem somente quando concentrados nas metodologias de diluição podem não apresentar qualquer atividade na difusão, provavelmente devido a suas composições. Outra observação feita na metodologia de difusão em ágar foi que os anti-sépticos quando diluídos apresentaram halos menores em algumas ocasiões e halos semelhantes em outras, demonstrando mais uma vez a heterogeneidade dos resultados gerados pela difusão em ágar.

Também não foi possível tecer uma comparação estatística entre a metodologia de difusão em ágar e as metodologias de diluição, pois a difusão gera dados interpretados qualitativamente como sensível, resistente ou dose-dependente, enquanto as metodologias de diluição geram dados quantitativos em valor de concentração inibitória mínima. Apesar da difusão gerar um valor do halo de inibição e mesmo ele sendo grande, não significa necessariamente que a substância apresenta uma CIM baixa, só demonstra que ela, além de apresentar atividade contra aquela cepa, tem boa difusibilidade no meio de cultura.

A literatura relata que as metodologias de difusão geram resultados similares as de diluição para os antifúngicos (BENNET *et al.*, 1966; MAGALDI *et al.*, 2004; MILICI *et al.*, 2007), não concordamos quando se trata da avaliação de anti-sépticos bucais, pois a difusão destes produtos pelo meio de cultura pode ser prejudicada provavelmente devido a sua composição. Indicamos assim, a utilização da macro ou microdiluição em caldo onde o anti-séptico fica em maior contato com o meio de cultura e com os microrganismos podendo demonstrar seu potencial antifúngico. Ressaltando que apesar da microdiluição ser um pouco mais trabalhosa que a difusão, ela não é uma metodologia cara e necessita dos mesmos cuidados quanto à padronização do inóculo, preparação dos meios de cultura e incubação que a

difusão em ágar e é capaz de detectar ação inibitória de anti-sépticos voláteis em menores concentrações.

Apesar do pequeno número de cepas avaliadas, os resultados indicam atividade antimicrobiana variada entre os produtos avaliados pelas metodologias de diluição. Todos os anti-sépticos apresentaram ação inibitória e fungicida nas concentrações disponíveis no comércio.

Os anti-sépticos bucais Noplak[®] (cloreto de cetilpiridínio e clorexidina), Oral B[®] (cloreto de cetilpiridínio), Periogard[®] (clorexidina), Plax[®] (triclosan) e Reach[®] (cloreto de cetilpiridínio) apresentaram atividades fungistáticas (CIM) e fungicidas (CFM) em baixas concentrações (1,25%) na grande maioria dos casos.

Os anti-sépticos Listerine[®] (óleos essenciais) e Malvatricin[®] (xilitol) apresentaram ação fungistática (CIM) entre 5 e 50% e fungicida (CFM) entre 10 e 100%, ou seja, em concentrações maiores que os outros anti-sépticos avaliados. Estas observações estão de acordo com Meiller e cols (2001) que obtiveram os valores mais altos de CIM e CFM para o Listerine[®] quando o avaliaram pela metodologia da macrodiluição em caldo frente às espécies de *Candida*.

Nossos resultados estão parcialmente de acordo com os observados Giuliana e cols (1997), pois os anti-sépticos contendo clorexidina, cloreto de cetilpiridínio e triclosan também apresentaram atividade inibitória e fungicida frente às cepas de *Cândida*. No entanto, para Giuliana e cols, o triclosan (Plax 45[®]) não apresentou efeito inibitório quando avaliado pela macrodiluição, enquanto que as cepas ATCC avaliadas foram inibidas (Apêndice A), provavelmente devido à presença do copolímero Gantrez na composição do Plax[®]. Segundo Marinho (2007) este copolímero é responsável por aumentar o espectro de ação do triclosan para leveduras.

A ação de Periogard[®] através da difusão em ágar frente a espécies de *Candida* já foi avaliada por Navarro e cols (1995), Candido e cols (1996) e Azevedo e cols (1999). Nossos resultados são similares aos publicados por esses autores,

todos eles concluíram que Periogard® apresenta ação inibitória frente à *Candida* e pode ser utilizado na prevenção e tratamento da candidíase bucal.

Concluimos que todos os anti-sépticos bucais avaliados (Listerine®, Malvatricin® Dentes Sensíveis, Noplak® Max, Oral B®, Periogard®, Plax® e Reach®) apresentam ação fungistática e fungicida satisfatórias, em pelo menos duas metodologias, frente a espécies de *Candida*. Os laboratórios responsáveis pela fabricação destes anti-sépticos indicam o uso das formulações puras e observamos que a maioria delas age *in vitro* em concentrações de 1,25% que representa uma diluição do produto em 1:80. Isto demonstra o potencial ainda inexplorado e pouco estudado destes produtos para tratamento e prevenção de candidíase bucal.

Apesar de eventuais diferenças entre os testes *in vitro* e *in vivo*, acreditamos que a avaliação da suscetibilidade *in vitro* é importante como método preliminar e em algumas situações pode ajudar o clínico na escolha de uma forma de tratamento para candidíase bucal alternativa aos antifúngicos.

6. Conclusões

CONCLUSÕES

A comparação dos meios RPMI 1640 e o Muller-Hinton nas três metodologias apresentou índices de concordância de bons a excelentes.

A metodologia da difusão em ágar em poços não foi capaz de detectar inibição de *Candida* com os anti-sépticos Listerine[®] e Malvatricin[®] Dentes Sensíveis.

A metodologia da difusão em ágar por meio de poços não deve ser utilizada nem mesmo para simples triagem na avaliação de anti-sépticos.

A comparação das metodologias de macro e microdiluição em caldo apresentaram índices de concordância de bom a excelente.

A microdiluição apresenta a vantagem de detectar a ação inibitória de anti-sépticos voláteis em menores concentrações.

Os anti-sépticos Listerine[®], Malvatricin[®] Dentes Sensíveis, Noplak[®]Max, Oral B[®], Periogard[®], Plax[®] e Reach[®] nas formulações comercializadas apresentam ação fungistática e fungicida *in vitro* frente às cepas ATCC de *Candida*.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, D.; ADDY, M. Mouthrinses. **Adv Dent Res** 8(2):291-301, 1994.

AKPAN, A.; Morgan R. Oral candidiasis. **Postgrad. Med. J**, 78: 455-459, 2002.

ALVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab**, 43 (5): 319-327, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil). Resolução RDC nº 211, de 14 jul. 2005. Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 jul. 2005. Disponível em <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17882&word=>. Acesso em 13 out. 2008.

AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C.; SALVETTI, C.; REZENDE, F. H. C. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. **Rev Microbiol**, 30: 335-341, 1999.

BARCHIESI, F.; COLOMBO, A. L.; MCGOUGH, D. A.; RINALDI, M. G. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standard. **J Clin Microbiol**, 32(10): 2494-2500, 1994.

BENNETT, J. V., J. L. BRODIE, E. J. BENNER, AND W. M. KIRBY. Simplified, accurate method for antibiotic assays of clinical specimens. **Appl. Microbiol.** 14: 170-177, 1966.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Publishing Group**, 3: 918-930, 2002.

BUGNO, A.; NICOLETTI, M. A.; ALMODÓVAR, A. B.; PEREIRA, T. C.; AURICCHIO, M.T. Antimicrobial efficacy of *curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. **Braz J Microbiol**, 38: 440-445, 2007.

BONADEO I. **Cosmética. Ciência y Tecnologia**. Madrid: Ed Ciência, 1988

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V.; ITO, I. Y. Determinação da concentração inibitória mínima de Cepacol, Malvona e Perigard, ante a *Candida albicans* isolada da cavidade bucal. **Rev. Odontol. UNESP**, 25(1): 9-84, 1996.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P. A., CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. **Med Mycol**, 39(4): 303-13, 2001.

DRUMOND, M. R. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PEREIRA, M. S. V.; PADILHA, W. W. N. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, 4(1): 33-38, 2004.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T. M.; GOLDSON, P. R.; SHADOMY S, Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests, **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1089-1094, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A. Standardized Disk Diffusion Method for Yeasts. **Clin Microbiol News**, 29(13): 97-100, 2007.

FARAH C.S., ASHMAN, R.B., CHALLACOMBE S.J. Oral Candidosis. **Clinic Dermatol**, 18: 553-562, 2000.

FERRAZZA MHS, MALUF MLF, CONSOLARO MEL, SHINOBU CS, SVIDZINSKI TIE, BATISTA MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 27(2): 58-63, 2005.

FROTA, F. **Farmacopéia Dos Estados Unidos Do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

GALGANI. J. N. Antifungal Susceptibility Tests. **Antimicrob Ag Chemoth**, 31(12): 1867-1870, 1987.

GALGANI. J. N. Susceptibility Testing of Fungi: Current Status of the Standardization Process . **Antimicrob Ag Chemoth**, 37(12): 2517-2521, 1993.

GHANNOUM M. A. E ABU-ELTEEN K. H. Pathogenicity determinants of Candida. **Mycoses (Mycoses)**, 33: 265-282, 1990.

GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Ciência e Cultura**, 26 (3): 45-58, 2002.

HOFFMAN, H. L.; PHARM. D.; PFALLER, M. A. In Vitro Antifungal Susceptibility Testing. **Pharmacotherapy**, 21(8 Pt 2): 111S-123S, 2001.

GIULIANA, G.; PIZZO, G.; MILICI, M. E.; MUSOTTO, G. C.; GIANGRECO, R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. **J Periodontol**, 68(8): 729-733, 1997.

JARDIM, P. S.; JARDIM, E. G J. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. **RGO**, 46(2): 79-84, 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL J.W. **The Yeasts: A taxonomic study**. 4ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica: fungos ascomicetos e algas de interesse médico**. 8a ed. São Paulo, 1991.

LAMFON, H.; PORTER, S. R.; MCCULLOUGH, M.; JONATHAN PRATTEN, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **J Antimicrob Chemoth**, 53: 383–385, 2004.

LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência Hoje**, 33(195): 66-69, 2003.

LIN, L. I. K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, 45 (1): 255–268, 1989.

MAGALDI S, CAMERO T. Susceptibilidad de *Candida albicans* *in vitro* mediante los pozos de difusión. **Bol Venez Infect**, 7(1): 5–8, 1997.

MAGALDI,S.; MATA-ESSAYAG.; CAPRILES,C. H.; PEREZ, C.; COLELLA, M. T. ; OLAIZOLA, C.; ONTIVEROS, Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **Intern J Infec Dis**, 8(1): 39-45, 2004.

MARINHO, B. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **Intern J Dent**, 6(4): 124-131 2007.

MARSH, P.D. Microbiological Aspects of the Chemical Control of Plaque and Gingivitis. **J Dent Res** 71 (7): 1431-1438, 1992

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE P. C. *Candida albicans*: a review of its history,taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 25: 136-144, 1996.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clin Microbiol Rev**, 12 (1): 147-179, 1999.

MEILLER, T. F.; KELLEY, J. I.; JABRA-RIZK, M. A.; DEPAOLA, L. G.; ABDULLAHEL BAQU, I. A. A. M.; FALKLER, W. A. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. **Oral S Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod**, 91(6): 663-670, 2001.

MILICI, M. E.; MAIDA, C. M.; SPREGHINI, E.; RAVAZZOLO, B.; OLIVERI, S.; SCALISE, G.; BARCHIESI F. Comparison between Disk Diffusion and Microdilution Methods for Determining Susceptibility of Clinical Fungal Isolates to Caspofungin. **J Clin Microbiol**, 45(11): 3529-3533, 2007.

NASCIMENTO, P. F. C. AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis pectinata* (L.) Poit. E DE COLUTÓRIOS SOBRE OS *Streptococcus mutans*. 2005. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Sergipe.

NAVARRO, C. C.; SANTOS, L. P. R.; MARCHI, S. P.; GUGELMIN, M. C. M. S.; SALVADOR, S. L. S.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans*: avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de anti-sépticos bucais sobre as cepas isoladas de próteses superiores. **R Esc Farm Odontol Alfenas**, 17: 56-59, 1995.

NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A2: Reference for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard. **NCCLS**, 17: 1-26, 1997.

NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Publication of M27-A2: Reference for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard. Second Edition. **NCCLS**, 22(15): 1-29, 2002.

PFALLER, M. A.; RINALDI, M. G.; GALGANI, J. N.; BARTLETT, M. S.; BODY, B.; ESPINEL-INGROFF, A.; FROMTLING, R. A. HALL, G. S.; HUGHES, C. E.; ODDS, F. C.; SUGAR, A. M. Collaborative Investigation of Variables in Susceptibility Testing of Yeasts. **Antimicrob Ag Chemoth**, 34(9): 1648-1654, 1990.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; KARLSSON, Å.; BOLMSTRO, A. Evaluation of the Etest Method for Determining Fluconazole Susceptibilities of 402 Clinical Yeast Isolates by Using Three Different Agar Media. **J Clin Microbiol**, 36(9): 2586–2589, 1998.

QUILES, J. C.; SALAZAR, B. L.; MÁRCIO SALAZAR, M.; ARAÚJO, M. G. Efeito do uso de Peroxyl® na redução da formação de placa bacteriana. **Rev Dental Press Periodontia Implantol**, 1(2): 26-34, 2007.

RADETSKY, M. ; WHEELER, R. C.; ROE, M. H.; TODD, J. K. Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome. **J Clin Microbiol**, 24(4): 600-606, 1986.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T.J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L.L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEENAN, D. J.; WARNOCK, D.W. Antifungal Susceptibility Testig Practical Aspects ans Current Challenges, **Clin Microbiol Rev**, 14(4): 643-658, 2001.

RODRÍGUEZ-TUDELLA, J. L.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELA, M.; CÓRDOBA, S. III Curso Hispano-Argentino de Micologia Médica, Buenos Aires, Argentina. *Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio*, 2001.

SALVADOR, M. J.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; CANDIDO, R. C.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Comparative study of antibacterial and antifugal activity of callus culture and adult plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Braz. J. Microbiol**, 35 (1): 131-136, 2004.

SEWELL, D. L.; PFALLER, M. A. ; BARRY, A. L. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. **J Clin Microbiol**, 32(9): 2099-2102, 1994.

SILVA, J. O.; FRANCESCHINI, S. A.; CANDIDO, R. C. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 61(2): 113-120, 2002.

GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Adv Dent Res**, 11(1): 160-167, 1997

SOLL, D.R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, 81: 101-10, 2002.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K.A.; COLEMAN, D. C.; BENNETT, D. E. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiol**, 21: 1507-1521, 1995.

TIBALLI, R. N.; ZARINS, L. T.; HE, X.; KAUFFMAN, C. A. *Torulopsis glabrata*: azole susceptibilities by microdilution colorimetric and macrodilution broth assays **J Clin Microbiol**, 33(10): 2612-2615, 1995.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, 3(2): 43-52, 2000.

WALKER, C. Antimicrobial agents and chemotherapy In: **Slots**, J. et al. Oral Microbiology And Immunology. St. Louis Mosby yearbook, 15: 5242-5264, 1992.

ZEGARELLI D. J.; Mouthwashes in the treatment of oral disease. **Drugs**, 42(2): 171-173, 1991.

Apêndices

APÊNDICE A - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de sete anti-sépticos bucais frente a *Candida sp* avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.

	<i>C. albicans</i>						<i>C. glabrata</i>						<i>C. krusei</i>						<i>C. parapsilosis</i>						<i>C. tropicalis</i>							
	Macro		Micro		Macro		Micro		Macro		Micro		Macro		Micro		Macro		Micro		Macro		Micro		Macro		Micro		Macro		Micro	
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M		
List	50	10	5	5	50	10	5	5	50	10	5	5	50	10	5	5	50	10	5	5	50	10	5	5	50	10	5	5	50	10	5	
Malv	10	10	50	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10	5	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10	5	
Nop	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	
OrB	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	
Plax	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	
Per	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	
Rea	10	50	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	

Macro: Macrodiluição; Micro: Microdiluição; R: RPMI-1640; M: Mueller Hinton; List: Listerine; Malv: Malvatricin; Nop: Noplak; Or B: Oral B; Per: Periogard; Rea: Reach.

APÊNDICE B- Valores de concentração fungicida mínima (CFM) de sete anti-sépticos bucais frente a *Candida sp* avaliados pelos métodos de micro e macrodiluição nos meios RPMI-1640 e Mueller-Hinton.

	<i>C. albicans</i>						<i>C. glabrata</i>						<i>C. krusei</i>						<i>C. parapsilosis</i>						<i>C. tropicalis</i>											
	Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro			Macro			Micro		
	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M				
List	50	10	5	5	50	10	10	5	10	50	50	5	10	50	5	10	50	5	5	5	5	50	10	5	5	5	5	50	10	5	5					
Malv	100	10	100	10	10	100	5	100	5	10	10	50	5	10	50	5	10	5	10	5	10	5	10	100	5	100	10	100	10	100	5	5				
Nop	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25				
Or B	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25				
Plax	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25				
Per	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25				
Rea	10	50	5	5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25				

Macro: Macrodiluição; Micro: Microdiluição; R: RPMI-1640; M: Mueller Hinton; List: Listerine; Malv: Malvatricin; Nop: Noplak; Or B: Oral B; Per: Periogard; Rea: Reach.

