

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS
SINTÉTICOS E NATURAIS FRENTE À *CANDIDA
DUBLINIENSIS* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO
FLUCONAZOL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cássia Franco Della M^éa Reginato

**Santa Maria, RS , Brasil
2013**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
AGENTES ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS E NATURAIS
FRENTE À *CANDIDA DUBLINIENSIS* SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

Cássia Franco Della Méa Reginato

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**

Orientadora: Prof^a Dra. Cristiane Cademartori Danesi

Santa Maria, RS , Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Franco Della M^{ea} Reginato, Cássia
AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÔNGICA DE AGENTES
ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS E NATURAIS FRENTE À CANDIDA
DUBLINIENSIS SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL /
Cássia Franco Della M^{ea} Reginato.-2013.
74 p.; 30cm

Orientador: Cristiane Cademartori Danesi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2013

1. Antissépticos 2. Candida 3. Suscetibilidade I.
Cademartori Danesi, Cristiane II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
AGENTES ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS E NATURAIS FRENTE
À *CANDIDA DUBLINIENSIS* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO
FLUCONAZOL**

elaborada por
Cássia Franco Della Méa Reginato

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas

COMISSÃO EXAMINADORA

Cristiane Cademartori Danesi, Dra.

(Presidente/ Orientador)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Carlos Heitor Moreira, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 23 de agosto de 2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço à **Deus** por ter me proporcionado uma oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Eu Te agradeço por ter me capacitado diante dos desafios, por diariamente ter renovado as minhas forças.

A minha orientadora **Prof.^a Dra. Cristiane Cademartori Danesi** por ter me proporcionado a oportunidade de ser acolhida pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas.

Ao **Prof. Dr. Sydney Hartz Alves** que me acolheu junto ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Agradeço pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos e sobre tudo pela amizade e confiança.

Agradeço a minha **família**, cujo amor, apoio, compreensão diante da correria ou das ausências foram fundamentais para que eu conseguisse completar esta árdua caminhada em busca dos meus sonhos. Vocês foram meu porto seguro, obrigada por me darem condições emocionais e financeiras para que eu possa crescer tanto como pessoa como da mulher profissionalmente. **Mãe** obrigada pelas orações, por me ouvir minhas reclamações, por compartilhar minhas conquistas comigo, por me esperar com o almoço pronto quando eu não tinha nem tempo de sentar para almoçar, teu suporte foi fundamental, te amo. **Pai Robinson**, obrigada por acreditar nos meus sonhos, por me incentivar e por sempre me apoiar financeiramente na busca dos meus sonhos. Obrigada pelos conselhos e por compreender minha ausência ao longo do mestrado, te amo.

Lizandra, minha irmã querida, obrigada pela companhia, pela amizade, pelas conversas de madrugada durante o estudo, tu és muito importante para mim, te amo. Ao meu **padrasto João Carlos**, obrigada pelos conselhos, pelas conversas, por sempre tentar me ajudar durante esta caminhada!!

Ao meu querido namorado **Thales**, obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade. Obrigada por corrigir tabelas comigo, tentar descobrir fórmulas no excel, revisar meus textos quando eu já estava cansada para enxergar os erros, obrigada por me apoiar na busca dos meus sonhos, tu és o companheiro que toda mulher deseja ter, obrigada por fazer parte da minha vida te amo querido!!

À minha querida amiga **Laíssa**, cuja responsabilidade e dedicação tornaram a realização deste trabalho, e conseqüentemente do meu mestrado, uma realidade. Sempre incansável ao longo dos últimos meses. Obrigada pela paciência em me ensinar a rotina do laboratório, pelo companheirismo e amizade. Obrigada por sentar na praça para tomar mate comigo, por ser minha técnica no futsal, por ser mais do que uma companheira de trabalho, obrigada por ser minha amiga.

À amiga “pra toda hora” **Mariana**, obrigada pelas mensagens de “bom dia” ou de incentivo logo cedo da manhã, obrigada por ser parceira de estudos, mates, jantas, por compartilhar os acontecimentos da minha vida, tu és uma “boa amiga” como me disseste uma vez, uma amiga de verdade, rara de se encontrar, que torce, vibra, chora e se irrita junto. Nunca esquecerei nossas tardes e noites de estudo, tua disciplina e determinação foram um exemplo para mim. Tua amizade é um dos presentes que ganhei durante o mestrado. Te adoro amiga!!

Ao **Prof. Paulo Peres**, que mais do que um colega de profissão se tornou um grande amigo e fonte de inspiração no exercício da docência tanto por sua dedicação ao exercício da odontologia como pelo seu companheirismo com os alunos. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, oportunidades concedidas e amizade.

Ao Prof. **Carlos Heitor Moreira** pelos ensinamentos ao longo do curso, por sua disponibilidade em solucionar meus questionamentos e por compor a banca examinadora contribuindo de forma significativa para este trabalho.

À professora "**Gisa**", cuja parceria surgiu ao findar desta caminhada. Obrigada pela amizade e oportunidade maravilhosa de trabalho junto ao Lar Recanto da Esperança.

Às minhas queridas amigas da "Panela de pressão", **Carina, Daniela, Joana, Jociana, Pauline e Renata** cuja amizade, apoio, risadas e jantinhas tornaram esta caminhada muito mais gostosa.

Às queridas companheiras do LAPEMI, **Débora, Laura, Luana, Tarcíeli** que me acolheram de forma carinhosa e cuja receptividade contribuiu para a realização deste trabalho. Em especial a **Francieli** cuja paixão pela pesquisa e pelo ensino são motivos de inspiração, obrigada pela tua disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas, pelo incentivo e amizade.

Ao querido companheiro de LAPEMICRO, **Zé**, obrigada pela parceria na reestruturação do laboratório, pelas conversas, cafés e amizade.

Aos queridos amigos e orientadores da UFPEL, Fabrício e Aline Ogliari, Otacilio Chagas Júnior, Camila Sonego e César Zanchi, obrigada pela amizade, incentivo, conselhos, conversas e oportunidades de crescimento profissional, admiro todos vocês!!

Aos queridos colegas de trabalho do **ambulatório Vila Noal** cujo ambiente maravilhoso de descontração e cooperação foi fundamental durante o mestrado, obrigada pelo apoio, compreensão e amizade.

A **Jéssica Dalcín da Silva** por sua total dedicação e disponibilidade, competência e agilidade na resolução dos mais diversos assuntos.

A todos os colegas da **5ª turma de mestrado** do PPGCO-UFSM.

Ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas** pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, em especial aos coordenadores **Profª Roselaíne Pozzobon** e **Profª Luiz Felipe Valandro**, obrigada pela disponibilidade em solucionar os mais diversos questionamento ao longo do curso.

EPÍGRAFE

“Um sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”

(Raul Seixas)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE AGENTES ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS E NATURAIS FRENTE À *CANDIDA DUBLINIENSIS* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL

AUTORA: CÁSSIA FRANCO DELLA MÉA REGINATO
ORIENTADORA: PROF^a. DRA. CRISTIANE CADEMARTORI DANESI
Data e Local de Defesa: Santa Maria, 23 de Agosto de 2013.

As susceptibilidades *in vitro* de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol (RF), *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol (SF) e *C. albicans* sensíveis ao fluconazol foram testadas para os antissépticos gluconato de clorexidina (CHX), cloreto de cetilpiridíneo (CPC), triclosan (TCS) e para os compostos naturais carvacrol, eugenol e timol. Em geral as cepas de *C. dubliniensis* SF apresentaram maior susceptibilidade aos agentes antissépticos do que as cepas *C. dubliniensis* RF e *C. albicans* SF. No entanto, para o antisséptico CHX as cepas de *C. dubliniensis* RF foram significativamente menos susceptíveis quando comparadas as demais. A atividade fungicida dos três grupos de isolados não mostrou diferença quanto a susceptibilidades para a CHX e o TCS, e o grupo RF foi tão sensível quanto *C. albicans* ao CPC. Em geral, foi observado um perfil semelhante de susceptibilidade aos produtos naturais. As susceptibilidades dos três grupos de *Candida spp* aos antissépticos confirmou boa atividade antifúngica. Os autores discutem a importância de controlar a susceptibilidade de *Candida* aos agentes antifúngicos, bem como antissépticos utilizados a fim de detectar o aparecimento de resistência aos antissépticos.

Palavras-chave: Antissépticos, Suscetibilidade, *Candida*.

ABSTRACT

Master Course Degree
Post Graduate Program in Dental Science - Master Level
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: CÁSSIA FRANCO DELLA MÉA REGINATO
SUPERVISOR: PROF. DRA. CRISTIANE CADEMARTORI DANESI
Date and Local: Santa Maria, August 23, 2013.

The susceptibilities of *C.dubliniensis* fluconazol-resistant (FR), *C. dubliniensis* fluconazole-susceptible (FS) and *C. albicans* from oral candidiasis were tested to antiseptics chlorhexidine gluconate (CHX), cetylpyridinium chloride (CPC), triclosan (TCS) and natural compounds carvacrol, eugenol and thymol. In general *C. dubliniensis* FS was more sensitive to antiseptics than *C. dubliniensis* FR and *C. albicans*. However to CHX the group FR was significantly less susceptible than the others. To fungicidal activity, the three groups did not show susceptibilities differences to CHX and TCS and the group FR was as sensitive as *C. albicans* to CPC. In general a similar profile of susceptibility was observed to natural products. The susceptibilities of the three groups of *Candida* spp to antiseptics confirmed the good antifungal activity of them. The authors discuss the importance of monitoring the susceptibility of *Candida* to antifungal agents as well as to antiseptics widely used in order to detect emergence of antiseptics resistance.

Keywords: Antiseptics; susceptibility; *Candida*.

LISTA DE TABELAS

Table 1: Comparison of the susceptibilities (MICs) of <i>Candida albicans</i> and fluconazole-susceptible and -resistant forms of <i>C. dubliniensis</i> to the inhibitory activity of synthetic and natural antiseptic compounds.....	51
Table 2: Comparison of the susceptibilities (MFCs) of <i>Candida albicans</i> and fluconazole-susceptible and -resistant forms of <i>C. dubliniensis</i> to the fungicidal activity of synthetic and natural antiseptic compounds.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
H	Hora (s)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
L	Litros
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
M27-A3	Reference Method of Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts
MIC	Minimal Inhibitory concentration
µg	Microgramas
µL	Microlitro
MFC	Minimal fungicidal concentration
MI	Mililitros
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS	Rio Grande do Sul
DAS	Sabouraud dextrose agar
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Spp.	Espécies
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USA	United States of America

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

LISTA DE ANEXOS

Tabela 1: CIM de antissépticos sintéticos frente à <i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol.....	64
Tabela 2: CIM de antissépticos naturais frente à <i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol	65
Tabela 3: CIM de antissépticos sintéticos frente à <i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.	66
Tabela 4: CIM de antissépticos naturais frente à <i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.....	67
Tabela 5: CIM de antissépticos sintéticos frente à <i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	68
Tabela 6: CIM de antissépticos naturais frente à <i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	69
Tabela 7: CFM de antissépticos sintéticos à <i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol.	70
Tabela 8: CFM de antissépticos naturais frente à <i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol.	71
Tabela 9: CFM de antissépticos sintéticos frente à <i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.	72
Tabela 10: CFM de antissépticos naturais frente à <i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol.....	73
Tabela 11: CFM antissépticos sintéticos frente à <i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.....	74
Tabela 12: CFM de antissépticos naturais frente à <i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol.	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Espécies do gênero <i>Candida</i>	20
2.1.1	<i>Candida albicans</i>	21
2.1.2	<i>Candida dubliniensis</i>	21
2.2	Epidemiologia e manifestações clínicas da candidose	23
2.3	Formas de tratamento	25
2.3.1	Fármacos antifúngicos.....	25
2.3.2	Suscetibilidade aos agentes antifúngicos	27
2.3.3	Resistência antifúngica.....	27
2.3.3.1	Resistência aos antifúngicos azólicos.....	28
2.4	Enxaguatórios bucais.....	29
2.4.1	Agentes antimicrobianos sintéticos	30
2.4.1.1	Cloreto de cetilpiridínio.....	30
2.4.1.2	Gluconato de clorexidina	31
2.4.1.3	Triclosan	33
2.4.2	Agentes antimicrobianos naturais	35
2.4.2.1	Carvacrol.....	36
2.4.2.2	Eugenol.....	37
2.4.2.3	Timol.....	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos Específicos.....	39
4	ARTIGO.....	40
4.1	Página de Título	41
4.2	Abstract	42
4.3	Introduction	43
4.4	Material and Methods.....	43
4.5	Results	45
4.6	Discussion	46
4.7	References	49

5	CONCLUSÃO	53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7	ANEXOS.....	64

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* caracterizam-se como micro-organismos oportunistas, os quais frente a determinadas circunstâncias que predisponham a sua proliferação exacerbada, passam a ser patogênicas ao homem. As manifestações clínicas incluem desde micoses superficiais, como a candidose orofaríngea, a condições mais invasivas e severas, com alto potencial de risco à vida do hospedeiro, como as candidemias (AKPAN & MORGAN, 2002; SULLIVAN, et al. 2004; MISHRA et al., 2007).

Embora *Candida albicans* seja apontada como a espécie mais prevalente nas manifestações clínicas de candidose oral, outras espécies não-*albicans*, como *Candida dubliniensis* tem sido identificadas como potenciais agentes etiológicos. Este fato assume importância clínica, uma vez que muitas destas espécies apresentam suscetibilidade reduzida a agentes antifúngicos tradicionalmente empregados no tratamento de infecções fúngicas, como os triazólicos, ou resistência à sua ação.

Apesar de ter sido raramente evidenciada no passado, a resistência antifúngica tem a sua emergência associada principalmente ao uso recorrente de agentes azólicos no tratamento de pacientes imunossuprimidos e traz como principais características associadas a elevação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antifúngicos, os menores índices de sucesso terapêutico, a recorrência das infecções e, de forma mais grave, os maiores índices de mortalidade (SANGLARD, 2003; JABRA-RIZK et al., 2004). Diante da crescente constatação da resistência antifúngica, do limitado número de antifúngicos disponíveis e do alto custo dos tratamentos, a busca por alternativas para o tratamento da candidose bucal fez crescer o interesse pela pesquisa de novas estratégias terapêuticas (VALE-SILVA et al., 2010; GARG & SINGH, 2011).

Neste contexto, os enxaguatórios bucais, tradicional método auxiliar para a remoção dos biofilmes orais, passaram a ser uma alternativa para a veiculação de substâncias antifúngicas, uma vez que atuam inviabilizando a colonização das superfícies do hospedeiro. Busca-se, através da prescrição dos enxaguatórios bucais, a superação das limitações atualmente evidenciadas na profilaxia das infecções fúngicas, uma vez que estes agentes atuam na manutenção do equilíbrio da microbiota bucal (CANNON& CHAFFIN, 1999, CAMPBELL et al., 2012).

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica de compostos sintéticos (cloreto de cetilpiridíneo, gluconato de clorexidina triclosan) e naturais (carvacrol, eugenol e timol) sobre isolados de *C. albicans*, sensíveis ao fluconazol e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol, bem como avaliar o perfil de suscetibilidade destas espécies frente aos compostos testados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécies do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte do reino Fungi; Filo *Ascomycota*; Classe *Hemiaslomyetes*; Ordem *Saccharomycetales* e família *Cryptococaceae*. O gênero *Candida* é composto por cerca de 200 espécies, e , destas, aproximadamente doze assumem importância clínica, uma vez que são importantes agentes etiológicos de processos infecciosos em seres humanos (BURNIE & MATTHEWS, 1998; AKPAN & MORGAN, 2002; SULLIVAN et al., 2003; SULLIVAN et al., 2005; PINTO et al. 2008; GIANNINI & SHEETY, 2011). Entre elas destaca-se as espécies *C. albicans*, principal espécie associada às infecções orais, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, e *C. dubliniensis* (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000). Esta última assume importância clínica tanto pela similaridade filogenética com *C. albicans*, como pela prevalência em pacientes portadores do vírus HIV (MORAN et al., 2012).

As espécies de *Candida* caracterizam-se por serem micro-organismos oportunistas que habitam de forma comensal as superfícies mucosas orofaríngeas de cerca de 50% à 60% de indivíduos saudáveis (HOEPELMAN & DUPONT, 1996; ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000). Embora inócuas na maior parte dos indivíduos, elas podem tornar-se patogênicas frente a determinadas circunstâncias que predispõem a sua proliferação, causando a infecção fúngica conhecida como candidose, termo que, segundo Marsch (2005), é o mais apropriado para denominar as manifestações clínicas resultantes da ação das espécies do gênero *Candida* (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; SULLIVAN et al., 2005; WEBSTER & WEBER, 2007, ELLEPOLA, 2010; ZHU & FILLER, 2010; MORAN et al., 2012).

Devido às diferenças quanto à epidemiologia, perfil de suscetibilidade e resistência antifúngica, faz-se necessário atentar para as características de cada espécie.

2.1.1 *Candida albicans*

A espécie *C. albicans* habita de forma comensal o trato gastrointestinal dos seres humanos, perfazendo cerca de 30 % a 50 % da microflora normal e, segundo Cannon & Chaffin (1999), a sua presença não se constitui em indicativo de existência de processo patológico (GIANNINI & SHETTY, 2011). Sob este aspecto, Akpan & Morgan (2002) correlacionam as taxas de incidência associadas a *C. albicans* em neonatos (45%), crianças saudáveis (45-65%) e adultos saudáveis (30-45%).

No entanto, esta espécie é dotada de mecanismos de virulência que lhe conferem uma melhor adaptação às adversidades do meio, permitindo a colonização e, frente a fatores que predisponham a sua proliferação, a invasão e infecção dos tecidos. Entre os fatores de virulência, destacam-se a capacidade de aderência, o dimorfismo, a variabilidade fenotípica e a produção de toxinas e enzimas extracelulares (CANNON & CHAFFIN, 1999; MORAN et al., 2012). No que diz respeito ao seu pleomorfismo, as formas hifais estão intimamente relacionadas à sua capacidade de aderir e invadir os tecidos, bem como de participar da formação de biofilmes, enquanto que as formas leveduriformes associam-se à capacidade dispersiva e colonizadora das superfícies (MORAN et al., 2012). Por deter tais características, que lhe conferem um maior grau de virulência, *C. albicans* é apontada como a espécie mais patogênica do gênero *Candida* (CANNON & CHAFFIN, 1999; MORAN et al., 2012).

Neste sentido, cabe ressaltar que, por ser a espécie de maior prevalência em sítios infectados, segundo Burnie & Matthews (1998) (70 à 80%), *C. albicans* é a espécie mais estudada entre todas pertencentes ao gênero *Candida* (MORAN et al., 2012).

2.1.2 *Candida dubliniensis*

C. dubliniensis, ainda que previamente evidenciada na década de 50, foi identificada apenas no ano de 1995, por Sullivan et al., na Universidade de Dublin, como espécie emergente, ao ser isolada da cavidade oral de pacientes irlandeses infectados pelo vírus HIV. Apesar de muitos estudos associarem a presença dessa espécie à ocorrência da candidose em pacientes portadores do vírus HIV ou detentores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

(SIDA), relatos evidenciam sua presença em pacientes imunocompetentes (SULLIVAN & COLEMAN, 1998; SULLIVAN et al., 2005; CHAVASCO et al., 2006).

Atribui-se a identificação tardia da *C. dubliniensis* ao fato desta espécie apresentar similaridade fenotípica (apresenta clamidiosporos e tubo germinativo) e bioquímica à *C. albicans* : ambas possuem cerca de 90 % de seus genes homólogos praticamente idênticos, o que dificulta a sua diferenciação por métodos de identificação não moleculares. A pouca precisão dos métodos tradicionalmente empregados para o reconhecimento das espécies fúngicas teria não só retardado sua identificação, mas também nomeado de forma errônea algumas cepas *C. dubliniensis* como *C. albicans* (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; SULLIVAN et al., 2004; SULLIVAN et al., 2005; CHAVASCO et al., 2006; SCHEID, 2007; ELLEPOLA, 2010; MORAN et al., 2012).

Estas observações conduziram a investigação por diversos autores na tentativa de demonstrar a existência de erros na identificação e diferenciação entre as espécies, a fim de demonstrar a real prevalência da espécie *C. dubliniensis* (SULLIVAN et al., 2005). Neste sentido, Odds et al. (1998), ao analisarem cerca de 2589 amostras, inicialmente descritas como *C. albicans*, concluíram que 2,1% da amostra era composta por *C. dubliniensis*. Em outro estudo, Jabra- Rizk et al. (2004) ao examinarem 1251 isolados, originalmente também descritos como *C. albicans*, observaram que 1,2% da amostra era constituída por *C. dubliniensis*. Da mesma forma, Colombo et al. (2003), ao investigarem uma coleção de 548 isolados de *C. albicans*, encontraram 11 cepas pertencentes à espécie *C. dubliniensis*.

C. dubliniensis assume importância clínica principalmente em pacientes imunossuprimidos, como os portadores do vírus HIV ou da SIDA: embora apresente menor patogenicidade quando comparada à *C. albicans*, tende a desenvolver resistência aos antifúngicos azólicos mais facilmente (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; SULLIVAN et al., 2004; SULLIVAN et al., 2005; ELLEPOLA, 2010). No que se refere a esta população , cujo fármaco de escolha é o fluconazol, Sullivan et al. (2004) afirmam que exposições repetidas a este antifúngico ocasionariam uma seleção, pela pressão positiva, das cepas detentoras de menor susceptibilidade, favorecendo a proliferação da espécie *C. dubliniensis* em detrimento da *C. albicans* na cavidade oral destes pacientes.

Embora *C. albicans* e *C. dubliniensis* demonstrem o mesmo espectro de susceptibilidade aos antifúngicos, de acordo com Scheid (2007), sucessivas exposições a concentrações subinibitórias de fluconazol acarretam alteração de propriedades da *C. dubliniensis* conferindo-lhe uma melhor adaptação à pressão seletiva antifúngica (SULLIVAN et al., 2004). Sob este ponto de vista, Borg-Von Zeppelin et al. (2002)

constataram que, ao ser adicionado fluconazol ao meio de cultura, ocorreu um aumento da adesão de *C. dubliniensis* às células epiteliais. Esse fato estaria relacionado à maior prevalência da *C. dubliniensis* em pacientes infectados pelo vírus HIV ou portadores da SIDA (SULLIVAN et al., 2004). No entanto, Scheid (2007) ressalta que, na ausência da pressão antifúngica, *C. albicans* segue como a espécie mais prevalente quando comparada com *C. dubliniensis*.

No que se refere à resistência antifúngica, a *C. dubliniensis* desenvolve mais facilmente resistência ao fluconazol, quando comparada a *C. albicans*, cuja resistência ocorre de forma instável. De acordo com Perea et al. (2002), o mecanismo de resistência mais frequentemente evidenciado nas espécies de *C. dubliniensis* seria a ativação das bombas de efluxo, promotoras da remoção dos agentes azólicos do interior das células fúngicas.

2.2 Epidemiologia e manifestações clínicas da candidose

A candidose oral é considerada a infecção fúngica que mais acomete o homem, e, por isso, é de suma importância saber correlacionar os fatores que predis põem o seu desenvolvimento (SCULLY et al., 1994; ELLEPOLA & SARAMANAYAKE, 2000; TRABOULSI et al. 2008). Entre os fatores predisponentes podem ser citados os que se relacionam diretamente ao hospedeiro como, a quebra das barreiras anatômicas, mudanças na microbiota autóctone do hospedeiro e alterações nos mecanismos de defesa, ou ainda os que se relacionam diretamente às espécies do gênero *Candida* (SCULLY et al., 1994; ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; AKPAN & MORGAN, 2002; NEVILLE et al., 2004; CASTRO, 2010; GIANNINI & SHETTY, 2011).

Os extremos etários estão relacionados com a maior predisposição para a ocorrência de infecções fúngicas, visto que, os recém-nascidos apresentam o sistema imune em processo de maturação e os idosos, demonstram debilidades nas funções normais de seu sistema imunológico com o avançar da idade (NEVILLE et al., 2004; AKPAN & MORGAN, 2002). Além disso, cabe ressaltar que, nas faixas etárias mais avançadas, é possível observar um maior número de usuários de próteses dentárias, artefato que, por atuar como uma barreira mecânica, dificulta a ação dos anticorpos salivares, favorecendo a acidificação do meio bucal e a consequente proliferação fúngica (CASTRO, 2010.).

No que se refere a mudanças na microbiota autóctone do hospedeiro, medicações antimicrobianas de amplo espectro têm como resultado de sua ação a supressão da flora bacteriana endógena e a eliminação das bactérias competidoras, favorecendo, dessa forma, o supercrescimento das espécies *Candida* (AKPAN & MORGAN, 2002). Além disso, sabe-se que outras medicações como anticolinérgicos, diuréticos e antidepressivos, por interferirem no volume e fluxo salivar normal, favorecem a proliferação das leveduras na cavidade bucal, criando um ambiente propício para a colonização por estas espécies (GIANNINI & SHETTY, 2011).

Ainda no que se refere às alterações de fluxo salivar, pacientes como os submetidos a tratamento radioterápico em região de cabeça e pescoço e os portadores de síndromes, como a de Sjogren, apresentam redução no volume e fluxo salivar e têm reduzidas a capacidade limpante da saliva e a secreção da imunoglobulina A, que atuam inviabilizando a colonização da cavidade oral pelas espécies de *Candida* (AKPAN & MORGAN, 2002; GIANNINI & SHETTY, 2011).

Em relação aos mecanismos de defesa do hospedeiro, nos últimos anos, tem sido possível observar um aumento da prevalência da candidose oral em pacientes em condições de supressão de seu sistema imunológico, tais como os portadores do vírus HIV, detentores da SIDA, transplantados, diabéticos ou submetidos ao tratamento antineoplásico (ELLEPOLA & SARAMANAYAKE, 2000; BASMA et al., 2008). Sob este aspecto, Neville et al. (2004) afirmam que a candidose oral é a manifestação intra-oral mais frequente em pacientes portadores do vírus HIV e, por isso, muitas vezes, é o sinal clínico que conduz ao diagnóstico inicial desta afecção, visto que aproximadamente 1/3 dos pacientes desenvolvem manifestações clínicas decorrentes da candidose oral (NEVILLE et al., 2004; AKPAN & MORGAN, 2002; GIANNINI & SHETTY, 2011; ELLEPOLA & SARAMANAYAKE, 2000).

Castro (2010), sobre este aspecto, acrescenta que a prevalência da candidose oral pode ser um importante fator preditivo, marcador da progressão da imunossupressão em pacientes HIV positivos, visto que cerca de 90% dos indivíduos infectados apresentam, em algum estágio da doença, manifestações clínicas relacionadas à candidose (ELLEPOLA & SARAMANAYAKE, 2000; AKPAN & MORGAN, 2002; NEVILLE et al., 2004; BASMA et al., 2008; TRABOULSI et al., 2008; GIANNINI & SHETTY, 2011).

A candidose apresenta formas variadas de manifestações clínicas, entre elas as formas pseudomembranosa, eritematosa, atrófica aguda, crônica hiperplásica, glossite mediana romboidal e a quelite angular, classificadas de acordo com as características clínicas e a localização de acometimento. Ressalte-se que elas podem variar desde manifestações

superficiais, até quadros de maior severidade, como os de acometimento sistêmico que, por gerarem repercussões mais graves ao hospedeiro, podem, inclusive, resultar em potencial risco de vida (SCULLY et al., 1994; ELLEPOLA & SARAMANAYAKE, 2000; AKPAN & MORGAN, 2002; NEVILLE et al., 2004; GIANINNI & SHETTY, 2011; MORAN et al., 2012).

Sabe-se, no entanto, que a maior parte das manifestações da candidose oral relaciona-se à formação de biofilmes nas superfícies epiteliais e protéticas do hospedeiro (JABRA-RIZK et al., 2004). Além de estarem associados às manifestações clínicas da candidose, os biofilmes viabilizam a colonização das superfícies do hospedeiro, proporcionam um estado de reduzida atividade metabólica através da cooperação entre as espécies envolvidas e exercem papel de barreira mecânica por dificultar a ação das defesas do sistema imunológico do hospedeiro e dos agentes antifúngicos. Tem-se, portanto, a formação dos biofilmes como um importante fator de virulência das espécies de *Candida* por constituírem-se em potenciais reservatórios para a inoculação e a disseminação da infecção para outras regiões do corpo (JABRA-RIZK et al., 2004; KOGA-ITO et al., 2006; TEN CATE et al., 2009; RAMAGE et al., 2011).

2.3 Formas de tratamento

2.3.1 Fármacos antifúngicos

Entende-se por antifúngico ou antimicótico toda a substância que tem a capacidade de evitar o crescimento de alguns tipos de fungos ou, inclusive, de provocar a sua morte. Os agentes poliênicos, os azólicos, as flucitosinas (5-FC) e as equinocandinas estão entre os antifúngicos disponíveis para tratamento das infecções fúngicas orais (GEORGOPAPADAKOU, 1998).

Segundo Fowler & Jones (1992), a escolha do antifúngico deve estar na dependência da severidade e da natureza da infecção (JABRA-RIZK et al., 2004). Conforme o grau de severidade, os fármacos antifúngicos podem ser aplicados diretamente na região, de forma tópica, como nos casos de infecções superficiais, ou ainda, de forma sistêmica, como no

tratamento de infecções recorrentes ou em candidemias. Fowler & Jones (1992) ainda esclarecem que, frequentemente, são prescritas formulações tópicas para o tratamento da candidose oral, já que possuem como vantagem o fato de não ocasionar toxicidade sistêmica e interação com outras drogas. No entanto, os agentes tópicos apresentam, como principais desvantagens, a necessidade de múltiplas aplicações diárias e o fato de verificar-se que, com a interrupção do tratamento, é comum a recorrência do quadro infeccioso (JUNQUEIRA et al., 2011; SENA et al., 2009). Vazquez (2000) complementa que, no tratamento de pacientes detentores da SIDA, apresentam-se recorrentes episódios de candidose orofaríngea, a terapia tópica possui menor eficácia quando comparada a terapia administrada de forma sistêmica. Junqueira et al. (2011) advertem, no entanto, que, a administração de agentes antifúngicos sistêmicos, diferentemente dos antimicrobianos, pode resultar na ocorrência de efeitos tóxicos às células do hospedeiro, visto que, tanto os fungos como os seres humanos, por se tratarem de seres eucariontes, apresentam estruturas celulares semelhantes.

Entre os fármacos estabelecidos para o tratamento das infecções fúngicas os mais, frequentemente, indicados são os agente poliênicos (Anfotericina B e Nistatina) e os derivados azólicos, medicações fungistáticas classificados em imidazóis (Cetoconazol e Miconazol) e triazóis (Itraconazol, Fluconazol e Voriconazol). Entre os seus representantes, o fluconazol tem sido associado ao desenvolvimento de resistência antifúngica e a seleção de espécies não-*albicans* quando administrado por períodos prolongados (SCULLY et al., 1994; GEORGOPAPADAKOU, 1998; TRABOULSI et al., 2008).

Dado o número limitado de opções de agentes antifúngicos para o tratamento da candidose, sendo ainda os mais empregados os poliênicos e os azólicos, buscou-se, como alternativa para a resistência observada às monoterapias tradicionalmente empregadas, a associação de drogas antifúngicas. No entanto, de acordo com Khan et al. (2011), não foram obtidos resultados satisfatórios, uma vez que foi possível constatar a ocorrência de efeitos adversos pelas associações realizadas.

Conclui-se que, apesar do incremento do número de casos de infecções fúngicas evidenciado nos últimos anos, o insucesso terapêutico não foi acompanhado pelo desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, de tal modo mantendo-se ainda limitado o número de drogas disponíveis para o tratamento da candidose (SANGLARD, 1998). Dessa forma, o tratamento das infecções fúngicas, mais especificamente, da candidose, através de monoterapias, tem se mostrado de difícil obtenção, determinando a busca por novas opções terapêuticas.

2.3.2 Suscetibilidade aos agentes antifúngicos

O estudo da suscetibilidade *in vitro* aos agentes antifúngicos permite selecionar o fármaco mais adequado para o tratamento das infecções micóticas. Para tanto, são empregados testes que auxiliam na identificação da existência de cepas resistentes. (método NCCLS ou NCCLS-like) Estes testes são baseados no documento M27-A2 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) que publicou a padronização do método de microdiluição em caldo para testes de suscetibilidade para fungos, cujo resultado é obtido através das concentrações inibitórias mínimas (CLSI, 2008a).

No que se refere à eficácia clínica dos agentes antifúngicos, a grande maioria dos isolados de *C. albicans* é suscetível aos agentes antifúngicos, e embora a suscetibilidade das leveduras desta espécie seja muitas vezes previsível, nem sempre é possível afirmar que uma determinada amostra seguirá o mesmo padrão geral. Além disso, estudos demonstram a existência de casos de resistência da espécie *C. albicans* aos derivados azólicos em pacientes portadores do vírus HIV (CROCCO et al., 2004).

Soma-se a este fato a emergência de espécies não-*albicans* com suscetibilidade reduzida ou intrinsecamente resistentes aos agentes antifúngicos. Estudos demonstram acentuadas diferenças na distribuição entre as espécies prevalentes e os perfis de suscetibilidade, corroborando para a necessidade de monitoramento do perfil de suscetibilidade aos agentes antifúngicos das espécies *Candida* (CROCCO et al., 2004; LORETO, 2006).

2.3.3 Resistência antifúngica

A resistência antifúngica é definida, por Sanglard (1998), como sendo a falha de um agente antifúngico na obtenção da cura de processos infecciosos, e, de acordo com Pfaller (2012), a mesma pode ser evidenciada tanto de forma clínica como microbiológica. Pfaller (2012) ainda acrescenta que é possível evidenciar a ocorrência de resistência microbiológica quando não se obtém a inibição do crescimento dos micro-organismos infectantes ou patogênicos através das concentrações usualmente empregadas, e consideradas seguras, do agente antimicrobiano. Neste sentido, Jabra-Rizk et al. (2004) definem a resistência clínica

como sendo a persistência ou a progressão da infecção fúngica, mesmo que empregada a terapêutica antifúngica apropriada.

Dentro deste contexto, a resistência antifúngica pode estar relacionada a características intrínsecas do fungo patogênico, como no caso da resistência primária, em que o micro-organismo demonstra possuir mecanismos de resistência ao agente antifúngico previamente à sua exposição, ou ainda, a características adquiridas, como na resistência secundária, quando o mesmo desenvolve-a em resposta à sua exposição (PFALLER, 2012). Da mesma forma, a resistência antifúngica também pode estar na dependência de fatores relacionados ao medicamento, como a forma de administração e perfil farmacocinético, e ao hospedeiro, mais especificamente, o estado imunológico que, em situações de comprometimento, torna-se mais suscetível à colonização dos micro-organismos patogênicos (PFALLER, 2012).

Embora raramente evidenciada no passado, nas últimas décadas, pode-se observar o incremento no número de casos de resistência aos agentes antifúngicos, principalmente, associado ao uso recorrente de agentes azólicos no tratamento de pacientes imunossuprimidos, visto que, em razão do comprometimento de seu sistema imune, apresentam uma maior suscetibilidade à ocorrência de infecções fúngicas oportunistas (SANGLARD, 2003; JABRA-RIZK et al., 2004).

Entre as principais consequências da emergência da resistência antifúngica, podem ser citadas a elevação das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos agentes antifúngicos, os menores índices de sucesso terapêutico, as recorrentes infecções durante a profilaxia ou o tratamento de pacientes imunossuprimidos, e, de forma mais grave, as maiores taxas de mortalidade.

2.3.3.1 Resistência aos antifúngicos azólicos

Segundo Sanglard (2003), os agentes azólicos são drogas de ação fungistática, que atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana plasmática dos seres fúngicos (VALE-SILVA et al., 2010). Segundo Vazquez (2000), por demonstrarem maior eficácia quando comparados aos agentes tópicos, passaram a ser o medicamento de escolha, principalmente em pacientes infectados pelo vírus HIV, substituindo o antifúngico tradicionalmente empregado, nomeado nistatina (CAVALCANTI et al., 2009). O Fluconazol, um agente antifúngico bis-triazólico, disponível nas formulações oral e parenteral, tem sido

preconizado como o medicamento de escolha por ser bem tolerado, não demonstrar alterações de suas propriedades frente a variações da acidez gástrica e resultar em menores efeitos adversos, quando comparado, por exemplo, com o Cetoconazol (VAZQUEZ, 2000; SCHEID, 2007; ZORE et al., 2011). Ademais, cumpre referir que são atribuídas à nistatina algumas restrições quanto à sua prescrição, como o sabor desagradável, os efeitos colaterais gastrointestinais e a necessidade de múltiplas aplicações diárias, que implicam em uma redução da adesão ao tratamento por parte dos pacientes.

No entanto, em conformidade com Sanglard (1998), raros eram os relatos de resistência aos agentes antifúngicos até a década de 80, e a ampla utilização do Fluconazol, a partir dos anos 90, principalmente em pacientes submetidos à terapia imunossupressiva, como os oncológicos e os portadores do vírus HIV, determinou o desenvolvimento da resistência antifúngica de espécies *C. albicans* e da seleção de espécies emergentes, não-*albicans*, como a *C. dubliniensis* (SANGLARD, 1998).

Sob este aspecto, Jabra-Rizk et al. (2004) esclarecem que a emergência da resistência antifúngica reside no fato de que a maior utilização de agentes azólicos, drogas com ação fungistática, apresentam a sua eficácia limitada no tratamento de pacientes imunossuprimidos, já que se faz necessária a atuação do sistema imunológico para a eliminação dos microorganismos patogênicos (SANGLARD, 2003; ZORE et al., 2011).

Dentro deste contexto, em que se observa a crescente propagação da resistência antifúngica, o ainda limitado número de antifúngicos disponíveis e o alto custo dos tratamentos por períodos prolongados em pacientes imunossuprimidos cujas recorrências são usuais, observa-se a real necessidade de alternativas que incrementem a eficácia do tratamento das infecções fúngicas (VALE-SILVA et al., 2010; GARG & SINGH, 2011).

2.4 Enxaguatórios bucais

Os enxaguatórios bucais são considerados um método auxiliar para a remoção química dos biofilmes orais, uma vez que visam a controlar o crescimento microbiano, prevenir infecções, e, na vigência de processos já consolidados, buscam reestabelecer o equilíbrio da cavidade bucal (CAVALCANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2011).

Mais especificamente, no caso da candidose oral, sabe-se que a adesão das espécies *Candida*, tanto às superfícies mucosas como às protéticas, é primordial para que ocorra a

colonização e infecção do hospedeiro. Neste sentido, a incorporação, na formulação dos enxaguatórios bucais, de agentes antimicrobianos detentores de atividade antifúngica atuaria na prevenção da formação dos biofilmes orais que viabilizam a colonização das superfícies do hospedeiro pelos patógenos (SHEP et al., 1999; GIULIANA et al., 1999; CASTRO, 2010; MAEKAWA et al., 2010).

Diante disso, diversos agentes antimicrobianos têm sido avaliados quanto às suas propriedades antifúngicas, estando, entre eles, agentes obtidos de forma sintética como o cloreto de cetilperidínio, o gluconato de clorexidina e o triclosan, e agentes derivados dos óleos essenciais tais, como o carvacrol, o eugenol e o timol.

2.4.1 Agentes antimicrobianos sintéticos

2.4.1.1 Cloreto de cetilpiridínio

O cloreto de cetilperidínio é um composto monovalente, catiônico, tensoativo pertencente aos compostos de amônia quartenária que apresenta amplo espectro antimicrobiano, principalmente sobre patógenos *gram*-positivos e leveduras (HAPS et al., 2008; MOREIRA et al., 2009, SHIM et al., 2012).

Este composto tem sido veiculado à formulação de enxaguatórios bucais nos Estados Unidos desde a década de 40 e encontra-se presente na formulação de enxaguatórios nacionais como o Cepacol e o Oral B (PARASKEVAS, 2005; MOREIRA et al., 2009).

Os efeitos deste composto na inibição da formação da placa e cálculo dentário foram descritos, pela primeira vez por Schroeder et al. (1962) na década de 60 e, desde então, pelos efeitos benéficos evidenciados na terapia periodontal, tem sido constantemente avaliado o seu papel na composição de enxaguatórios bucais (RENTON-HARPER et al., 1996; PARASKEVAS, 2005; HAPS et al., 2008; SILVA et al., 2011; SHIM et al., 2012).

Evidências mostram que o mecanismo de ação do cloreto de cetilperidínio está relacionado ao aumento da permeabilidade da parede celular (MOREIRA et al., 2009; THOMAS, 2011). Adicionalmente, Cannon & Chaffin (1999), afirmam que o cloreto de Cetilperidíneo provocaria a redução da hidrofobicidade da superfície celular da espécie *C.*

albicans, limitando, portanto, a adesão das células fúngicas às células epiteliais bucais do hospedeiro. Corroborando com tal hipótese, Fathilah et al. (2012) afirmam que o cloreto de cetilpiridíneo alteraria a tensão superficial e ocasionaria a ruptura da parede celular fúngica, estando a sua ação na dependência da concentração utilizada.

Em estudo *in vitro*, Giulianna et al. (1999) comprovaram a atividade antifúngica do cloreto de cetilpiridíneo contra cepas do gênero *Candida*. Apesar de este composto ter apresentado valores inferiores de CIM quando comparado ao gluconato de clorexidina, diferentemente da mesma, demonstrou ser efetivo contra todas as espécies testadas.

No entanto, apesar da sua ampla utilização é importante ressaltar que o cloreto de cetilpiridínio demonstra efeitos adversos, decorrentes do uso prolongado, tais como, a descoloração dentária, a sensação de ardência bucal, ulcerações recorrentes e aumento da formação de cálculo. (TORRES et al., 2000; PARASKEVAS, 2005; MOREIRA et al., 2009; THOMAS, 2011)

2.4.1.2 Gluconato de clorexidina

Desenvolvido durante a década de 40, pelas indústrias químicas imperiais da Inglaterra, como forma de tratamento da malária, o gluconato de clorexidina foi introduzido no mercado em 1954 visando à antissepsia de feridas na pele, profilaxia de profissionais da saúde e pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos. O gluconato de clorexidina que teve, em um primeiro momento, a sua utilização vinculada a procedimentos desinfetantes, nos dias atuais, é o antisséptico de eleição na odontologia (BASCONES & MORANTE, 2006).

Esta molécula catiônica é a principal representante da classe das bisbiguanidas e encontra-se disponível na forma de sais de digluconato. Em síntese, o gluconato de clorexidina exibe propriedades como eficácia sob as baixas concentrações, alta substantividade que lhe confere uma ação terapêutica de aproximadamente 12 horas na cavidade bucal, baixa absorção pelo trato gastrointestinal, além de atividade antimicrobiana sobre amplo espectro de micro-organismos como vírus lipofílicos, fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2001; PARASKEVAS, 2005; GISSONI et al, 2008; MOREIRA et al., 2009; MAEKAWA et al., 2010; SILVA et al., 2011) .

O gluconato de clorexidina tem sido amplamente utilizado como antisséptico bucal na odontologia sob a concentração de 0,2%. Dentro deste contexto, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* comprovam o efeito antifúngico do gluconato de clorexidina, sendo empregado de forma adjunta aos antifúngicos no tratamento de candidose oral desde a década de 70, tanto em casos de estomatite protética como na desinfecção de próteses dentárias (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2001).

Embora o modo de ação do gluconato de clorexidina nas células fúngicas ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que este agente antisséptico possua a capacidade de interferir em diversos fatores associados à patogenicidade das espécies *Candida*, tais como a adesão às células epiteliais e superfícies abióticas, a formação do tubo germinativo e a hidrofobicidade da superfície celular destas espécies (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2001).

Neste sentido, diversos estudos demonstraram que a realização de bochechos com gluconato de clorexidina a 0,2%, pelo tempo de um minuto, tende reduzir a capacidade de adesão das espécies *Candida* às células epiteliais tanto em indivíduos saudáveis (TOBGI et al., 1987; GORMAN et al., 1987) como em pacientes diabéticos (DARWAZEH et al, 1994). De acordo com Cannon & Chaffin (1999), a exposição da *C. albicans* por um curto período de tempo, ou ainda, a concentrações subletais de clorexidina, parece afetar a parede celular fúngica, reduzindo a capacidade de adesão das mesmas. Além disso, a incubação do acrílico de próteses dentárias ao gluconato de clorexidina também exerce efeito redutor na adesão das células fúngicas (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2001).

Sabe-se que a hidrofobicidade da superfície celular é considerada um fator não biológico relacionado à capacidade de adesão das células fúngicas, em que as células hidrofóbicas são dotadas de maior capacidade de adesão e, portanto, detentoras de maior virulência. Em estudo realizado por Anil et al. (2001), foi possível observar que quando a espécie *C. albicans* foi submetida a uma breve exposição ao gluconato de clorexidina a 0,2%, houve uma redução significativa da hidrofobicidade da superfície celular desta espécie.

Outro fator associado à capacidade de adesão das células fúngicas das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* é a capacidade de formar tubos germinativos, estruturas cilíndricas que facilitam a adesão das células fúngicas às células epiteliais, que conferem uma certa resistência à fagocitose pelas defesas do organismo (ANIL et al, 2001). Recentemente, Ellepola (2010) demonstrou que a breve exposição a concentrações sub-terapêuticas de gluconato de clorexidina a 0,2 % à espécie *C. dubliniensis* ocasionou a supressão da capacidade de formação dos tubos germinativos.

Em conformidade com Shrestha (2011) o gluconato de clorexidina, na concentração de 0,2% pode ser empregado de forma adjunta às drogas antifúngicas não somente pela comprovada atividade antimicrobiana, mas também por deter liberação lenta e gradual, características responsáveis pelo seu efeito prolongado na cavidade bucal. Bascones & Morante (2006) acrescentam que após a realização de bochechos, cerca de 30% do princípio ativo da clorexidina permanece retido na cavidade bucal, sendo liberado de forma gradual em um intervalo de tempo de oito a 12 horas, podendo ainda ser encontrado na cavidade bucal decorridas 24 horas da realização do bochecho.

Segundo Bascones & Morante (2006), não existem relatos na literatura quanto à toxicidade sistêmica provocada pela aplicação tópica do gluconato de clorexidina, que apresenta baixa absorção pelo trato gastrointestinal, sendo eliminada pelas fezes (90%) e urina (1%) (PARASKEVAS, 2005). No entanto, o gluconato de clorexidina tem a sua prescrição restrita a casos específicos e por curtos períodos de tempo, já que efeitos adversos como manchamento de superfícies dentárias, protéticas e mucosas, alteração de paladar, descamação reversível da mucosa e aumento dos depósitos calcificados supragengivais limitam o uso prolongado deste agente antisséptico (TORRES et al., 2000; BASCONES & MORANTE, 2006; CAVALCANTI et al., 2009; ELLEPOLA, 2010; MAEKAWA et al., 2010). Todavia, Torres et al. (2000) esclarecem que o manchamento dentário ocorre na película adquirida, sendo passível de remoção profilática por se tratar de manchamento extrínseco.

2.4.1.3 Triclosan

Produzido, inicialmente, pela Companhia Ciba-Geigy (Suíça) em meados dos anos 60, foi introduzido na indústria farmacêutica apenas no ano de 1972, e, posteriormente, na composição de dentífricos, no ano de 1985. Este agente antimicrobiano, tem sido amplamente utilizado na composição de produtos de cuidados pessoais como sabonetes, desodorantes, produtos antissépticos para pele, dentífricos e enxaguatórios bucais por deter atividades antimicrobiana, antiparasitária e anti-inflamatória (JONES et al., 2000; YU et al., 2011). Schweizer (2001) complementa que existem cerca de 700 produtos cuja formulação contém o triclosan. A utilização do triclosan está vinculada ao fato deste composto não apresentar toxicidade aos tecidos da cavidade bucal, nem efeito carcinogênico ou mutagênico,

demonstrando, dessa forma, relativa segurança para a utilização em preparações orais, tais como, dentifrícios e enxaguatórios bucais (BHARGAVA & LEONARD, 1996).

O Triclosan (2,4,4-tricloro-2-hidroxi-difenil) é um bisfenol clorado, lipossolúvel não iônico, incolor, inodoro e insípido, que de acordo com Ferreira et al. (2008), mesmo apresentando um amplo espectro antimicrobiano, não promove desequilíbrio na cavidade bucal (JONES et al., 2000; AROONRERK & DHANESHUAN, 2007; GISSONI et al., 2008; MOREIRA et al., 2009).

Este antisséptico por apresentar rápida liberação dos sítios de ligação, sendo característica a sua baixa substantividade, tem sido associado a outros produtos, entre eles o copolímero gantrez (metoxietileno mais ácido maleico), a fim de aumentar o seu tempo de permanência na cavidade bucal (FERREIRA et al., 2008, MOREIRA et al., 2009). Além disso, segundo Moreira et al. (2009), a associação do triclosan com o copolímero gantrez apresentaria a vantagem de aumentar o seu espectro de ação, atuando também sobre bactérias gram-negativas e leveduras.

Diversos estudos demonstram a potente ação antifúngica do Triclosan. (AROONRERK & DHANESHUAN, 2007; PATEL et al., 2008; SILVA et al., 2011). Patel et al. (2008) evidenciaram a capacidade do Triclosan de provocar a redução da contagem de *Candida* na saliva de pacientes infectados pelo vírus HIV. Miquino et al. (1999) verificaram, em estudo realizado com enxaguatórios disponíveis no mercado nacional, que os produtos que continham o Triclosan em sua formulação foram os mais eficazes na inibição da microbiota bucal.

De acordo com Silva et al. (2011), o modo de ação do Triclosan estaria relacionado a lise da membrana citoplasmática dos micro-organismos. Schweizer (2001) complementa que o Triclosan, ao inibir as sínteses proteica, lipídica e de RNA, provocaria a lise celular.

Cabe ressaltar que não há ainda um consenso na literatura no que concerne ao efeito do triclosan em pacientes que façam uso de fluconazol. Yu et al. (2011), em estudo realizado *in vitro*, constataram o efeito antifúngico do triclosan em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol quando combinado ao fluconazol, sugerindo, através dos resultados obtidos, a associação entre os dois compostos para a obtenção, pelo efeito sinérgico, de maior eficácia terapêutica. Em contrapartida, Higgins et al. (2012) ao investigarem a atividade do triclosan nas espécies *C. dubliniensis* e *C. albicans* susceptíveis a agentes azólicos, evidenciaram a ocorrência de antagonismo nas formas hifais de *C. albicans*, e a ausência do efeito antagônico na espécie *C. dubliniensis*, em que se constatou apenas o efeito fungicida.

2.4.2 Agentes antimicrobianos naturais

Os óleos essenciais são definidos por Santos et al. (2010) como sendo misturas complexas de substâncias voláteis de baixo peso molecular, cuja origem está no metabolismo secundário vegetal de plantas nativas de regiões temperadas. Acredita-se que, embora composto por cerca de 20-60 componentes, em diferentes concentrações, apenas dois ou três constituintes determinem as suas propriedades biológicas, caracterizando, dessa forma, o seu modo de ação (BAKKALI et al., 2008; VALE-SILVA et al., 2010).

Dados da literatura revelam que a utilização de plantas com finalidade terapêutica datam de tempos primórdios, sendo que, somente a partir da década de 70, a OMS passou a estimular o desenvolvimento de pesquisas com fins de comprovação quanto à aplicabilidade das propriedades farmacológicas das plantas medicinais popularmente empregadas na área da saúde (ASSIS, 2009). No presente momento, Bakkali et al. (2008) destacam que são conhecidos cerca de 3000 tipos de óleos essenciais, e, destes, aproximadamente, 300 possuem aplicações comerciais, sendo amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacológica (BAKKALI et al., 2008; VALE-SILVA et al., 2010).

Recentemente, devido à emergência da resistência antifúngica e ao insucesso terapêutico, fez-se necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, as fontes naturais, como os óleos essenciais, receberam destaque, não apenas por sua ampla utilização em várias regiões do mundo como agentes de cuidados primários em saúde, mas também por demonstrarem atividade antifúngica, tornando-se, assim, potenciais alternativas para o tratamento das candidose (NOSTRO et al., 2007; GUO et al., 2009; ZORE et al., 2011; PORTILLO-RUIZ et al., 2012).

É interessante destacar que Lima et al. (2006) citam, em seu estudo, que cerca de 60% dos óleos essenciais apresentam propriedades antifúngicas. Sobre este aspecto, Molina et al. (2008), acrescentam que a associação de plantas medicinais à dentifrícios ou aos colutórios bucais tem sido investigada com a finalidade de reduzir a atividade de micro-organismos residentes na cavidade bucal. Zore et al. (2011) complementam que o crescente interesse pelas propriedades dos derivados dos óleos essenciais residiria não apenas na busca por uma terapia de maior eficácia no tratamento das infecções fúngicas, mas também pela prevenção dos efeitos adversos provenientes das altas doses empregadas e dos tratamentos prolongados, através da associação de drogas sintéticas e produtos naturais. Neste sentido, Lima et al. (2006) advogam o uso de produtos naturais, detentores de atividade antimicrobiana, por

propiciar um menor risco de toxicidade ao hospedeiro quando comparados com os agentes antifúngicos comumente empregados.

Entre os mecanismos de ação evidenciados pelos óleos essenciais, Bakkali et al. (2008) esclarecem que a despolarização das membranas mitocondriais de células eucariotas, por provocar a redução do potencial de polarização e gerar um aumento nos níveis de transporte passivo de prótons, ocasiona alterações na permeabilidade celular, que resultam na morte celular por apoptose ou necrose.

Além disso, a sua atuação também parece estar relacionada à inibição da síntese do ergosterol e às propriedades hidrofílicas dos seus componentes que auxiliam na penetração das células microbianas. Estudos demonstram que, pelo fato de os derivados dos óleos essenciais atuarem simultaneamente sobre vários alvos, não foi observada, até o presente momento, resistência por parte dos micro-organismos aos óleos essenciais (NOSTRO et al., 2007; BAKALLI et al., 2008).

2.4.2.1 Carvacrol

O carvacrol (5-Isopropil-2metilfenol) é um composto fenólico presente na composição de vários óleos essenciais, sendo o principal constituinte do óleo essencial de orégano, amplamente empregado na indústria alimentar como flavorizante (OBAIDAT et al., 2011).

Além de seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, o carvacrol demonstra ação inseticida, antioxidante, antibacteriana, antiparasitária, bem como, uma potente atividade antifúngica contra cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol. (CHAMI et al., 2005; MARCO-ARIAS et al., 2011). Além disso, tem recebido papel de destaque nas pesquisas, por promover a ruptura do biofilme microbiano, que tem a sua formação associada não somente à patogênese de uma série de processos infecciosos, mas também à resistência antifúngica. (IANNITELLI et al., 2011)

De acordo com Portillo-Ruiz et al. (2012) a presença do radical hidroxil confere ao carvacrol propriedades hidrofílicas, que por facilitarem a sua penetração nas membranas microbianas resultam no aumento da permeabilidade celular e conseqüentemente na perda da integridade celular. Ainda de acordo com Marco-Arias et al. (2011), o mecanismo de ação do carvacrol, também poderia estar relacionado à inibição da biossíntese do ergosterol.

Em estudo *in vivo* realizado em ratos imunossuprimidos, Chami et al. (2004) avaliaram o efeito do carvacrol demonstrando que este composto reduziu de forma significativa o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) nas amostras recolhidas da cavidade oral de ratos submetidos ao tratamento com o carvacrol, assim como não houve evidência histológica de colonização por partes das formas hifais no dorso lingual destes animais, comprovando, dessa forma, a atividade antifúngica deste composto.

Adicionalmente, Chami et al. (2005), em estudo realizado *in vitro* em *C. albicans* e *in vivo* em ratos imunossuprimidos avaliaram a atividade antifúngica do carvacrol a 0,1% e do eugenol a 0,2%, demonstrando que estes compostos detêm atividade fungicida, provocando a morte das células leveduriformes de forma dose-dependente, sendo capazes de reduzir de forma significativa a contagem de UFCs das amostras coletadas da cavidade oral dos ratos avaliados.

2.4.2.2 Eugenol

O eugenol (4-*alil*-2-metóxi-fenol), um composto aromático derivado do fenilpropano, é o principal componente dos óleos de cravo e canela, e possui potente atividade antifúngica, mais especificamente, em cepas de *Candida* resistentes e sensíveis ao fluconazol (HE et al., 2007; MARCO-ARIAS et al., 2011).

Sobre este aspecto, Chami et al. (2004) analisaram, a atividade antifúngica do eugenol em amostras coletadas da cavidade bucal de ratos imunossuprimidos, em que foi evidenciada a redução das UFCs após oito dias de aplicação tópica de solução à base de eugenol. Ainda no que se refere à atividade antifúngica do eugenol, Rego et al. (2003) citam que estudos têm demonstrado a relativa efetividade do eugenol em espécies *Candida* quando utilizado em selamentos de canais radiculares submetidos a tratamentos endodônticos.

De acordo com Garg & Singh (2011), o eugenol além da comprovada atividade antifúngica, exerceria importante papel anti-inflamatório nas infecções fúngicas causadas por *Candida albicans*, por promover alívio da sintomatologia dolorosa.

Cumprir referir que o mecanismo de ação parece estar relacionado à inibição da biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana lipídica dos seres fúngicos, o que ocasionaria alterações na permeabilidade celular (MARCO-ARIAS et al., 2011).

2.4.2.3 Timol

O Timol, (2-isopropil-5-metilfenol), um monoterpene fenólico e isômero químico do carvacrol, é um dos principais constituintes do óleo de tomilho, e faz parte da composição do enxaguatório bucal, popularmente, conhecido como Listerine (CHAMI et al., 2005; MARCO-ARIAS et al., 2011).

De acordo com Braga et al. (2008), este composto apresenta propriedades farmacológicas como a atividade antimicrobiana e antifúngica, e merece destaque nas pesquisas, por atuar nas fases iniciais de formação do biofilme, durante a transição das formas planctônicas para as formas sésseis de *C. albicans*, interferindo na aderência das espécies *Candida* às superfícies mucosas do trato vaginal e oral do hospedeiro.

Ademais, cumpre referir que, segundo o estudo de Braga et al. (2007), o timol assume um comportamento anfipático, uma vez que, este composto atua tanto na estrutura como nas superfícies eletrostáticas das membranas celulares fúngicas, originando, dessa forma, tensões assimétricas que interferem na permeabilidade celular (MARCO-ARIAS et al., 2011; SHRESTHA, 2011).

Em estudo recentemente realizado, Vale-Silva et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica do óleo de Tomilho, composto principalmente pelo carvacrol e timol, em espécies *Candida*, e concluíram que este composto detém um amplo espectro de atividade antifúngica, exercendo, inclusive, ação fungicida contra esta espécie.

Já Guo et al. (2009) investigaram a atividade antifúngica do timol contra isolados clínicos de *Candida albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol e demonstraram que este composto ao ser associado ao fluconazol ou à anfotericina, demonstra maior eficácia do que quando empregado de forma isolada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica, *in vitro*, de compostos utilizados em antissépticos bucais, bem como de compostos ainda não utilizados para este fim, frente a *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antifúngica de compostos utilizados em soluções antissépticas de uso oral como cloreto de cetilpiridíneo, gluconato de clorexidina, triclosan e timol frente *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Avaliar a atividade antifúngica do carvacrol e eugenol frente à *Candida albicans* e à *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Comparar, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs), a atividade de todos os compostos estudados frente à *Candida albicans* e à *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Comparar, com base nas concentrações fungicidas mínimas (CFMs), a atividade de todos os compostos estudados frente à *Candida albicans* e à *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

4 ARTIGO

ARTIGO - *In vitro* antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against fluconazole-susceptible and -resistant oral isolates of *Candida dubliniensis*

Este artigo foi submetido à publicação no periódico Journal of Applied Oral Science .
ISSN: 1678-7757 .

4.1 Página de Título

In vitro antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against fluconazole-susceptible and -resistant oral isolates of *Candida dubliniensis*.

Cássia F. Reginato^{a*}, Laíssa A. Bandeira^b, Régis A. Zanette^c, Janio M. Santurio^d, Sydney H. Alves^e, Cristiane C. Danesi^f

^a Mestranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria – RS – Brasil,

^b Mestranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil,

^c Doutorando –Programa de Pós Graduação em Farmacologia , Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^d Professor Associado- Doutor- Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul ,Brasil.

^e Professor Associado -Doutor- Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul ,Brasil.

^f Professora Adjunta - Doutora- Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul ,Brasil.

*Corresponding author: Cássia Franco Reginato

E- mail adress:cassiafranco@outlook.com

Prédio 20; Sala 4139; Campus da UFSM.

Bairro Camobi, Santa Maria – RS.

CEP; 97105-900

Fone-Fax: (55) 32208906

In vitro antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against fluconazole-susceptible and -resistant oral isolates of *Candida dubliniensis*.

4.2 Abstract

The susceptibility of oral candidiasis-derived forms of *C. albicans* and fluconazol-resistant (FR) and fluconazole-susceptible (FS) forms of *C. dubliniensis* to the antiseptics chlorhexidinegluconate (CHX), cetylpyridinium chloride (CPC) and triclosan (TCS) and the natural compounds carvacrol, eugenol and thymol was tested. In general, FS *C. dubliniensis* was more sensitive to antiseptics than FR *C. dubliniensis* and *C. albicans*. However, the FR group was significantly less susceptible to CHX than the others. Regarding fungicidal activity, the three groups did not show susceptibility differences to CHX or TCS, and the FR group was as sensitive as *C. albicans* to CPC. In general, a similar profile of susceptibility was observed to natural products. The susceptibility of the three groups of *Candida* spp to antiseptics confirmed their efficacy and safety. The authors discuss the importance of monitoring susceptibility to antifungal agents as well as to widely used antiseptics to detect the emergence of resistant *Candida* spp.

Keywords: Antiseptics, Susceptibility, *Candida* .

4.3 Introduction

Candidiasis is the most frequent fungal infection among immune-compromised patients. These infections are very common in the mouth because *Candida* spp are a commensal inhabitant and may also contaminate other lesions. *Candida albicans* is the most frequently occurring species, but non-*albicans* *Candida* species are also becoming more common. Among them, *C. dubliniensis* deserves special attention. *C. dubliniensis* was recognized as a new species in 1995 when it was isolated from the oral cavities of HIV-infected and AIDS patients¹. *C. dubliniensis* shares many phenotypic characteristics with *C. albicans*, but its ability to become resistant to fluconazole is notable².

In odontology, as well as in the therapy of cancer patients undergoing antineoplastic and/or radiotherapy, the use of mouthwashes as adjuncts to antimicrobial agents has become well established. Such mouthwashes have been formulated to contain various antiseptics, such as chlorhexidine gluconate (CHX), cetylpyridinium chloride (CPC), triclosan (TRC), thymol and eugenol³⁻⁶. The antibacterial activity of these compounds is well known, but the susceptibility of fungal flora to them, especially *Candida* spp, has not been well-studied.

Among *Candida* spp, the development of antifungal resistance is an emergent phenomenon that can be confirmed through standardized susceptibility tests⁷.

In this scenario, it is not clear how oral antiseptics can inhibit fluconazole-resistant *Candida* spp, as this question has not yet been studied. Therefore, here we compared the susceptibility of *C. albicans*, fluconazole-susceptible (FS) *C. dubliniensis* and fluconazole-resistant (FR) *C. dubliniensis* to well-known antiseptics, as to the natural compounds eugenol, carvacrol and thymol.

4.4 Material and Methods

Microorganisms. A group of 20 strains of *C. dubliniensis* and another group of 20 strains of *C. albicans*, both isolated from oropharyngeal candidiasis, were selected. Because the susceptibility of the strains to fluconazole was already known, these groups were named the fluconazole-susceptible (FS) *C. dubliniensis* group and the *C. albicans* group. A 3rd group was created from the fluconazole-susceptible (FS) *C. dubliniensis* group by exposing these

strains to increasing concentrations of fluconazole, as proposed by Fekete-Forgács et al.⁸. The 3rd group (n = 20) was named the fluconazole-resistant (FR) *C. dubliniensis* group.

Antimicrobial agents. The compounds studied included the synthetic compounds chlorhexidinegluconate (CHX), cetylpyridinium chloride (CPC) and triclosan (TRC). The natural compounds studied included carvacrol, eugenol and thymol. All evaluated compounds were purchased from Sigma-Aldrich Pharmaceuticals (Saint Louis, MO, USA).

Antifungal susceptibility tests. The antimicrobial agents were diluted to create stock solutions and the concentrations tested, respectively: chlorhexidinegluconate (10 mg/mL; 0.4 – 250 µg/mL), cetylpyridinium chloride (10 mg/mL; 0.04 to 25 µg/mL), triclosan (10 mg/mL; 0.04-25 µg/mL), carvacrol (20 mg/mL; 1.22 – 625 µg/mL), eugenol (50 mg/mL; 2.44 – 1250 µg/mL) and thymol (10 mg/mL; 1.22 – 625 µg/mL). Chlorhexidinegluconate, cetylpyridinium chloride and triclosan were diluted in distilled water, and carvacrol, eugenol and thymol were diluted in methanol. One-hundred-microliter aliquots of two-fold diluted compounds were dispensed into 96-well microtiter plates. The MICs (minimal inhibitory concentrations) of the compounds were determined using a microdilution technique based on protocol M27-A3, which was approved by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in 2008. The medium consisted of RPMI 1640 broth buffered with MOPS with 2% dextrose added. The inocula were standardized by suspending the yeasts (five colonies grown on Sabouraud dextrose agar) in saline solution (0.085%) and adjusting the turbidity according to protocol M27-A3. The tests were performed in triplicate. Each series included a positive (diluted inoculum working solution) and a negative (RPMI 1640 alone) control for growth. The cell suspensions were diluted 1:50 with distilled water and 1:20 with RPMI 1640 medium. One-hundred-microliter aliquots of the cell suspensions were added to each well of a microdilution plate, which was subsequently incubated at 35 °C for 48 hours. Yeast growth was monitored visually. The MIC of each compound was defined as the lowest concentration required to arrest visible fungal growth at the end of the 48-hour incubation. The minimal fungicidal concentrations (MFCs) were determined by subculturing 0.01 mL from each well that lacked visible growth in the MIC assay on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates. The lowest concentration of the antimicrobial agents at which negative growth was registered was considered the minimal fungicidal concentration.

Statistical analysis. The susceptibilities (MICs and MFCs) of the *C. albicans*, fluconazole-susceptible (FS) *C. dubliniensis*, and fluconazole-resistant (FR) *C. dubliniensis* groups to each antiseptic studied were compared using Mann-Whitney's test. P values < 0.05 were considered significant.

4.5 Results

Based on the MICs, the susceptibility profiles of *C. albicans*, fluconazole-susceptible (FS) *C. dubliniensis* and fluconazole-resistant (FR) *C. dubliniensis* to synthetic and natural antiseptics are shown in Table 1.

Based on the geometric mean (GM), among the synthetic antiseptics, cetylpyridinium chloride (CPC) showed the best activity against *C. albicans*, (FS) *C. dubliniensis* and fluconazole-resistant (FR) *C. dubliniensis*. When we compared these three groups, the FS *C. dubliniensis* group was significantly more susceptible than the *C. albicans* ($p < 0.001$) or FR *C. dubliniensis* ($p < 0.02$) groups.

The second-most active antiseptic agent tested was chlorhexidine gluconate (CHX); *C. albicans* was significantly less susceptible to CHX than the FS *C. dubliniensis* ($p < 0.04$) group, but significantly more susceptible than the FR *C. dubliniensis* ($p < 0.02$) group.

The susceptibility tests to triclosan (TRC) revealed that *C. albicans* was significantly less susceptible than the FS *C. dubliniensis* ($p < 0.02$) group, but no differences were detected between the FR *C. dubliniensis* and *C. albicans* groups.

Among the natural essential oils compounds, comparisons of the three studied groups with carvacrol showed that the FS *C. dubliniensis* group was more susceptible than the FR *C. dubliniensis* ($p < 0.02$) and *C. albicans* ($p < 0.01$) groups.

When we tested eugenol, the *C. albicans* group was less susceptible to it than the FR *C. dubliniensis* ($p < 0.02$) and FS *C. dubliniensis* ($p < 0.05$) groups, but a comparison of the FS and FR *C. dubliniensis* groups did not reveal any differences in their susceptibility to eugenol.

The tests of thymol showed only that the *C. albicans* group was significantly more susceptible than the FR *C. dubliniensis* group; the other comparisons did not reveal any significant differences.

Fungicidal activity was evaluated by measuring minimum fungicidal concentrations (MFC), (Table 2). Differences in susceptibility to the activity of the fungicides were detected only in the tests of cetylpyridinium chloride (the FS *C. dubliniensis* group was more susceptible than *C. albicans*; $p < 0.03$), carvacrol (the FR *C. dubliniensis* group was more susceptible than the FS *C. dubliniensis* group; $p < 0.04$) and eugenol (the FR *C. dubliniensis*

group was more susceptible than the FS *C. dubliniensis* group; $p < 0.01$). All other tests of minimum fungicidal concentrations did not reveal any significant differences among the groups.

4.6 Discussion

Among the etiological agents responsible for oral candidiasis in immune-compromised patients, we included *C. albicans* because it is the most studied yeast-like fungi, but this study emphasizes the susceptibility of *C. dubliniensis* due to its ability to become resistant to fluconazole; therefore, we selected a group of markedly fluconazole-resistant strains of *C. dubliniensis*. The susceptibility of *C. dubliniensis* to antiseptics is largely unknown.

The antiseptics chlorhexidine gluconate, cetylpyridinium chloride and triclosan are commonly added to toothpastes, hand soaps and mouthwashes as adjunct antifungal therapies for candidiasis. Chlorhexidine gluconate is a biguanide compound and is most likely the most widely used biocide in antiseptic products⁹. Cetylpyridinium chloride is a cationic, active by-product of quaternary ammonium compounds, and triclosan is a bisphenol compound that is also commonly included in consumer hygiene products⁹.

In general, focusing on the fungistatic activity of the compounds, the MICs of the fluconazole-resistant *C. dubliniensis* group were similar to those of the *C. albicans* group. The fluconazole-susceptible *C. dubliniensis* group was significantly more sensitive than the other groups. However, measuring the fungicidal activity of the compounds did not reveal differences in the susceptibility of the groups to chlorhexidine and triclosan. The fluconazole-susceptible *C. dubliniensis* group was more sensitive to cetylpyridinium chloride than the other groups, and the FR group was less sensitive to chlorhexidine chloride. Although this reduced susceptibility was not evident in the MFC, we think it serves as a warning sign of the development of resistance.

Chlorhexidine chloride is considered an appropriate adjunct or alternative to a specific and widely recommended topical antifungal therapy that consists of the administration of 0.2% chlorhexidine gluconate via a mouthwash. Chlorhexidine induces the coagulation of nucleoproteins, inhibits budding and causes changes in the cell wall that leads to the escape of cytoplasmic components and results in the death of the yeast⁵. Using different techniques, Shrestha et al.⁵ found that *C. tropicalis* was less susceptible than *C. albicans*. Fathilah et al.¹⁰

has also reported elevated MICs for *C. tropicalis* (75 µg/ml) and *C. krusei* (150 µg/ml). These MICs are much more elevated than the MICs we obtained (3.63 to 8.14 µg/ml), which reinforces that there are differences in the susceptibility of *Candida* spp to chlorhexidine. Thurnmond et al.¹¹ reported variations in the MICs of *Candida albicans* following daily exposure to this antiseptic; the 5 – 10 µg/ml MIC range found in the first week increased to 2.5 – 20 µg/ml in week 8. These findings are consistent with reports of variation in the degree of efficacy of stomatitis in reducing the number and occurrence of oral *Candida*, oral candidiasis and *Candida*-related morbidity and mortality¹².

Cetylpyridinium chloride (CPC) is a cationic antiseptic. Chemically, it is a quaternary ammonium compound. It alters and modifies the surface tension of the cell wall structure, which may lead to cell wall leakage. CPC is widely used in mouthwashes for the prevention or treatment of candidiasis and bacterial infections⁹. Based on measurements of the MIC, we found a greater activity of CPC (1.56 to 5.02 µg/ml) than Fathilahet al.¹⁰ found for *C. tropicalis* (66 µg/ml) and *C. krusei* (33 µg/ml). Edling et al.¹³ has shown that two strains of fluconazole-resistant *C. albicans* exhibit reduced CPC susceptibility, suggesting that mouthwashes with CPC might select for resistant strains. Our results did not confirm this possibility because FR *C. dubliniensis* showed a similar susceptibility as *C. albicans*, although we did not test *C. tropicalis* and *C. krusei*.

Our tests of triclosan showed that the FR *C. dubliniensis* group was similarly sensitive to triclosan as *C. albicans*, and the FS *C. dubliniensis* group was more sensitive than *C. albicans*; the MICs ranged from 6.25 to 25 µg/ml. Our results contrast with those of Jones et al.¹⁴, who reviewed the activity of triclosan against fungi and detected MICs ranging from 1.63 µg/ml for *Epidermophyton floccosum* to 5000 µg/ml for *Blastomyces dermatitidis*; *C. tropicalis* ATCC 750 was inhibited by 2500 µg/ml. In China, Yu et al.¹⁵ studied the interaction of triclosan and fluconazole against fluconazole-resistant *C. albicans* and reported MICs ranging from 32 to 64 µg/ml; when fluconazole and triclosan were combined, the MICs of triclosan decreased to 4-8 µg/ml, which suggests that fluconazole resistance affects susceptibility to triclosan; we did not detect this phenomenon in our study.

Carvacrol, eugenol and thymol are natural compounds and consist of the main fraction of essential oils from *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum* and *Thymus vulgaris*, respectively. Chemically, these compounds are terpenoids, which have antimicrobial properties against a wide range of pathogens, including *Candida* spp¹⁶

Based on the MICs and MFSs of carvacrol, the FS *C. dubliniensis* group was significantly more susceptible than the FR *C. dubliniensis* and *C. albicans* groups. The FR *C. dubliniensis* group exhibited a similar susceptibility profile as *C. albicans* to fungistatic and

fungicidal concentrations of carvacrol. The susceptibility of *C. dubliniensis* to carvacrol has not been well studied, and only a small number of isolates have been included⁴. Here, the MICs for *C. albicans* (78.2 – 312.5 µg/mL) were higher than the 0.16 µg/mL reported for *C. albicans* and *C. dubliniensis* by Vale-Silva et al.¹⁷. These authors also reported that the MFC for carvacrol (0.16 µg/mL) was similar to the MIC. In general, our results showed that MFCs were higher than MICs.

The MIC of eugenol was more elevated for the FR *C. dubliniensis* group than for the FS *C. dubliniensis* group, but when we studied the fungicidal activity of eugenol, the FR group was more susceptible than the FS group. Similar results were reported by Ahmad et al.¹⁸, who noted that fluconazole-resistant strains show higher sensitivity to eugenol than standard or clinical strains. In addition to its use as an antiseptic, eugenol is applied topically to dental cavities, used as a component of dental protectives and also combined with zinc oxide to form zinc oxide eugenol, which has restorative and prosthodontic applications in dentistry¹⁹.

Among the natural compounds studied here, thymol exhibited the greatest activity against *C. albicans* (MG of MICs = 175.94 µg/mL), which was significantly more susceptible than the FR *C. dubliniensis* group (MG= 388.08 µg/mL). In contrast, when we evaluated the activity of fungicidal concentrations of thymol, we did not detect differences between the three groups. Guo et al.²⁰ studied the activity of thymol against fluconazole-susceptible and -resistant *C. albicans*; our results (based on MIC ranges), were more elevated than their findings. Thymol causes protein denaturation and damage to cellular membranes, resulting in leakage of the intracellular components⁵.

Our results indicated that the MICs of carvacrol, eugenol and thymol were higher for the FR *C. dubliniensis* group than for the FS *C. dubliniensis* group. However, when we studied the susceptibility to fungicidal concentrations of carvacrol and thymol, the FR group showed higher sensitivity than the FS group. As suggested by Ahmad et al.¹⁸, the antifungal activity of carvacrol, eugenol and thymol against fluconazole-resistant and -susceptible forms of *C. dubliniensis* emphasizes that these compounds could expand the class of beneficial antifungal agents. They might also be better employed in pharmaceutical products as antiseptic solutions for mouthwashes.

Finally, our results provide evidence for two conclusions: the majority of the results suggest that fluconazole-resistant strains of *C. dubliniensis* are more sensitive to antiseptics than *C. albicans* and indicate that the antiseptics studied exhibit good activity and are safe; in contrast, some discrepancies in the data suggest that fluconazole-resistance may change the susceptibility to antiseptics. As stated by Fraise, “changes in the cell wall may also play a

role in the cross-resistance between biocides and antibiotics, most likely reducing permeability²¹. So, we must be alert for changes in the susceptibility of yeasts to antiseptics, because the number of antimycotics – some of them targeting the cell wall – are growing.

4.7 References

1. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dublinensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995;141:1507-152.
2. Moran GP Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dublinensis* isolates from Human Immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 617-623.
3. Aroorerk N, Dhanesuan N. *Candida* inhibitory effects of six commercial mouthwashes. *Ann of Microbiol* 2007; 57(3): 449-452.
4. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11: 119.
5. Shresta A, Rimal J, Rao A, Sequeira PS, Doshi D, Bhat GK. *In vitro* antifungal effect of mouth rinses containing chlorhexidine and thymol. *J. Dent Scienc* 2011; 6: 1-5.
6. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto GC, Giangreco R. *In vitro* antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *J. Periodontol* 1997; 68: 729-733.
7. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2008a. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts, Approved standard M27-A3*, 3rd ed., CLSI, Wayne, 25 pp
8. Fekete-Forgács K, Gyurc L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 1999; 43: 273-279.
9. McDonnell G, Russell D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 147-179.
10. Fathilah AR, Himratul-Aznita WH, Fatheen ARN, Suriani KR. The antifungal properties of chlorhexidinedigluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. *J Dent* 2012; 40: 609-615.

11. Thurmond JM, Brown AT, Sims RE, Ferretti GA, Raybould TP, Lillich TT, Henslee PJ. Oral *Candida albicans* in bone marrow transplant patients given chlorhexidine rinses: occurrence and susceptibilities to the agent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72: 291-295.
12. McGaw WT, Belch A. Oral complications of acute leukemia: prophylactic impact of a chlorhexidine mouth rinse regimen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 275-280.
13. Edling MP, Smith WL, Edlind TD. Effects of cetylpyridinium chloride resistance and treatment on fluconazole activity versus *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 843-845.
14. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control* 2000; 28: 184-196.
15. Yu L, Ling G, Deng X, Jin J, Jin Q, Guo N. In vitro interaction between fluconazole and triclosan against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3609-3612.
16. Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian J. Microbiol.* 2008; 54: 950-956.
17. Vale-Silva L, GonçalvesMJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Pinto E. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophytes species. *Planta Med.* 2010; 76: 882-888.
18. Ahmad A, Khan A, Ahmad L, Manzoor N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against *Candida* isolates. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59: 1178-1184.
19. Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pisal SS. Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for treatment of periodontal disease. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30: 195-203.
20. Guo N, Liu J, Wu X, Bi X, Meng R, Wang X, Xiang H, Deng X, Yu L. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58: 1074-1079.
21. Fraiese, AP. Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause concern? *J. Antimicrob Chemother.* 2002; 49: 11-12.
- 22.

Table 1: Comparison of the susceptibilities (MICs) of *Candida albicans* and fluconazole-susceptible and -resistant forms of *C. dubliniensis* to the inhibitory activity of synthetic and natural antiseptic compounds

Antiseptics	Groups*	MIC range**	G Mean**	Comparisons	p values
Cetylpyridinium chloride	A	0.78 – 6.25	1.56	A x B	P < 0.02
	B	1.56 – 6.25	5.02	A x C	P < 0.01
	C	3.12 – 6.25	4.26	B x C	P > 0.05
Gluconate Chlorhexidine	A	0.97 – 7.8	3.63	A x B	P < 0.05
	B	1.95 – 15.6	8.14	A x C	P < 0.04
	C	1.95 – 7.8	5.14	B x C	P < 0.02
Triclosan	A	0.78 – 25	10.50	A x B	P < 0.05
	B	6.25 - 25	18.46	A x C	P < 0.02
	C	6.25 – 25	17.07	B x C	P > 0.05
Carvacrol	A	78.1 – 625	206.35	A x B	P < 0.02
	B	78.1 – 312.5	211.56	A x C	P < 0.01
	C	78.2 – 312.5	213.60	B x C	P > 0.05
Eugenol	A	312.5 - 625	603.71	A x B	P > 0.05
	B	156.5 - 625	625	A x C	P < 0.05
	C	156.2 - 625	422.68	B x C	P < 0.02
Thymol	A	39.06 - 625	211.32	A x B	P > 0.05
	B	156.2 - 625	388.08	A x C	P > 0.05
	C	78.2 - 625	175.94	B x C	P < 0.05

*A = *Candida dubliniensis* fluconazole-susceptible

B= *Candida dubliniensis* fluconazole-resistant

C= *Candida albicans*

**µg/ml

Table 2: Comparison of the susceptibilities (MFCs) of *Candida albicans* and fluconazole-susceptible and -resistant forms of *C. dubliniensis* to the fungicidal activity of synthetic and natural antiseptic compounds

Antiseptics	Groups*	MIC range**	G Mean**	Comparisons	p values
Cetylpyridinium chloride	A	0.78 - 50	3.01	A x B	P > 0.05
	B	1.56 - 25	5.02	A x C	P < 0.03
	C	3.12 - 25	7.69	B x C	P > 0.05
Gluconate Chlorhexidine	A	0.97 - 500	8.28	A x B	P > 0.05
	B	1.95 - 250	8.14	A x C	P > 0.05
	C	3.9 - 31.25	6.56	B x C	P < 0.05
Triclosan	A	1.56 - 50	2.76	A x B	P > 0.05
	B	6.25 - 50	18.46	A x C	P > 0.05
	C	6.25 - 50	18.94	B x C	P > 0.05
Carvacrol	A	156 - 625	301.84	A x B	P < 0.04
	B	156 - 625	211.56	A x C	P > 0.05
	C	156 - 312	262.75	B x C	P > 0.05
Eugenol	A	625 - 2500	915.05	A x B	P < 0.01
	B	312 - 2500	625	A x C	P > 0.05
	C	625 - 1250	769.46	B x C	P > 0.05
Thymol	A	312 - 625	298.86	A x B	P > 0.05
	B	312 - 625	388.08	A x C	P > 0.05
	C	78.12 - 625	358.96	B x C	P > 0.05

*A = *Candida dubliniensis* fluconazole-susceptible

B= *Candida dubliniensis* fluconazole-resistant

C= *Candida albicans*

**µg/ml

5 CONCLUSÃO

Com base nos valores das médias geométricas, entre os compostos sintéticos, o cloreto de cetilpiridíneo (CPC) apresentou a melhor atividade contra *C. albicans*, e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Quando submetidos a comparação, o grupo *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol foi significativamente mais sensível do que o grupo *C. albicans* ($p < 0.001$) e *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol ($p < 0.02$).

O segundo composto com melhor atividade antifúngica foi o gluconato de clorexidina (CHX); *C. albicans* foi significativamente menos suscetível ao CHX do que o grupo *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol ($p < 0.04$), mas significativamente mais suscetível que o grupo *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol ($p < 0.02$).

Os testes de suscetibilidade ao triclosan (TRC) revelaram que *C. albicans* foi significativamente menos suscetível que o grupo *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol ($p < 0.02$), no entanto, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol e *C. albicans*.

Entre os compostos derivados dos óleos essenciais, o grupo *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol foi mais sensível à ação do carvacrol que os grupos *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol ($p < 0.02$) e *C. albicans* ($p < 0.01$). Quando testado o eugenol, o grupo *C. albicans* foi o mais sensível a sua ação do que os grupos *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol ($p < 0.02$) e *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol ($p < 0.05$), no entanto, quando realizada comparação entre os grupos *C. dubliniensis* sensível e resistente ao fluconazol, não foram evidenciadas diferenças significativas. Os testes realizados com o timol demonstraram que apenas o grupo *C. albicans* foi significativamente mais sensível a sua ação e que as demais comparações não demonstraram diferenças significativas.

A atividade fungicida foi avaliada através da determinação das concentrações fungicidas mínimas (CFM). Foi possível constatar diferença significativa nos compostos cloreto de cetilpiridíneo (o grupo *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol foi mais sensível a sua ação do que o grupo *C. albicans*; $p < 0.03$), carvacrol (o grupo *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol foi mais sensível à sua ação do que o grupo *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol; $p < 0.04$) e eugenol (o grupo *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol foi mais sensível à sua ação do que *C. dubliniensis* sensível ao fluconazol; $p < 0.01$). Todos os outros testes realizados para avaliar a concentração fungicida mínima não revelaram diferenças significativas entre os grupos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p. 1178-1184, 2010.

AKPAN, A; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Journal of Postgraduate medicine**, v.78, p.455-459, 2002.

ANIL,S.; ELEPOLLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. The impact of chlorexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. **Oral Diseases**, v.7, p.119-122, 2001.

AROONRERK, N.; DHANESUAN, N. *Candida* inhibitory effects of six commercial mouthwashes. **Annals of Microbiology**, v.57,n. 3, p. 449-452, 2007.

ASSIS,C. de. Plantas medicinais na odontologia. **Revista brasileira de Odontologia.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p.72-75, jan./jun. 2009

BAKALLI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 , p. 446–475, 2008.

BASCONES, A; MORANTE, S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. **Avances en periodoncia e implantología oral**, v.18, n. 1, p.31-59, 2006.

BASMA, R.; BARADA, G.; OJAIMI, N; KHALAF, R.A. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. **Mycoses**, v.52, p. 41-148, 2008.

BHARGAVA, H. N; LEONARD, P.A. Triclosan: Applications and safety, **American Journal of Infection Control**, v.24, n.3, p. 209-218, June, 1996.

BORG-VON ZEPELIN, M et al. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. **AIDS**, v.14, n. 9, p. 1237-1244, 2002.

BRAGA, P.C. ; DAL SASSO, M. ; CULICI, M. ; ALFIERI, M . Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v.78, p.396-400, 2007.

BRAGA, P.C.; CULICI, M. ; ALFIERI, M. ; DAL SASSO . Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, p.472-477, 2008.

BURNIE, J.; MATTHEWS, R. The epidemiology and pathogenesis of Candidiasis: applications in prevention and treatment. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.96, p. 249-256, 1998.

CAMPBELL, B.C.; CHAN, K. L.; KIM, J.H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungals agents. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1-20, 2012.

CANNON, R.D ; CHAFFIN, W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. v.10, n.3, p. 359-383, 1999.

CASTRO, A.G. Estudo comparativo da eficácia entre a utilização da terapia fotodinâmica (PDT) e da nistatina (MICOSTATIN) no tratamento da candidíase oral em pacientes HIV. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade Paulista, São Paulo, 2010.

CAVALCANTI, A.L. et al. Atividade antifúngica in vitro de enxaguatórios bucais sobre *Candida spp*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v.38, n.5, p.313-17, set./out. 2009.

CHAMI, N. et al. Antifungal Treatment With carvacrol and eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p.217-226, June, 2004.

CHAMI, N. et al. Antifungal effect of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. **Oral Microbiology Immunology**, v. 20, p. 106–111, 2005.

CHAVASCO, J.K. et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV- negative patients in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.1, p. 21-26, Jan./Feb., 2006.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI): Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne : Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.

COLOMBO, A.L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M. et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v.22, p.470-474, 2003.

CROCCO, E.I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.79, n.6, p.689-697, nov/dez. 2004.

DARWAZEH, A.M.; LAMEY, P.J.; MACFARLANE, T.W. The effect of exposure to chlorhexidine gluconate *in vitro* and *in vivo* on *in vitro* adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells from diabetic and non-diabetic subjects. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 23, p.130-132, 1994.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral candida infections and antimycotics. **Critical Reviews of Oral Biology & Medicine**, v.11, n.2, p.172-198, 2000.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. **Oral Diseases**, v.7, p. 11-17, 2001.

ELLEPOLA, A.N.B. . The effect of brief exposure to sub-therapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate on germ tube formation of oral *Candida dubliniensis*. **Mycoses** v.54, e330-e335, 2010.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, p. 273 – 279, 2000.

FATHILAH, A.R.; HIMRATUL-AZNITA, W.H.; FATHEEN, A.R.N; SURIANI, K.R. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. **Journal of dentistry**, v. 40, p.609-615, 2012.

FERREIRA, A.F et al. Agentes antissépticos e enxaguatórios na odontologia Disponível em : <<https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/SA08-21014.PDF>> Acesso em : 10 de outubro de 2012.

FOWLER, S.; JONES, D.S. Modified adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in vitro following treatment with cationic, non-antibiotic antimicrobial agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v.86 , p.193-199, 1992.

GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of Eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 87, p. 280-288, 2011.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v.1, p. 547-557, 1998.

GIANNINI, P.J.; SHETTY, K.V. Diagnosis and management of oral Candidiasis. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v.44, p.231-240, 2011.

GISSONI, M. ;TAVARES, E. ; MARTINEZ, H . Soluções químicas para uso tópico bucal-classificação e advertências. *Revista Brasileira de Odontologia*, Rio de Janeiro, v.65, n.1, p.36-41, jan./jun., 2008.

GIULIANNA, G.; PIZZO, G; MILICI, M.E.; GIANGRECO, R. GIANGRECO. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v. 87, n.1, Jan., p. 44-49, 1999.

GORMAN, S.P.; MCCAFFERTY, D.F.; WOOLFSON, A.D. A comparative study of the microbial antiadherence capacities of three antimicrobial agents. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 12, p. 393-399, 1987.

GUO, N. et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, v.58, p. 1074–1079, 2009.

HAPS, S.; SLOT, D.E.; BERCHIER, C.E.;VAN DER WEIJDEN. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *International Journal of Dental Hygiene*, v. 6, p. 290-303, 2008

HE, M.; DU, M.; FAN, M.; BIAN, Z. In vitro activity of Eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, v. 163, p.137-143, 2007.

HIGGINS, J. et al. Triclosan antagonizes Fluconazole activity against *Candida albicans*. *International & American Associations for Dental Research*, v. 91, n. 1, p.65-70, 2012.

HOEPELMAN, I.M.; DUPONT, B. Oral Candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 6, p. 155-159, 1996.

IANNITELLI, A et al. Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p.5039-5051, 2011.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER, W.A.; MEILLER, T.F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 14-19, Jan., 2004.

JACOB, L. S.; FLAITSZ, C. M.; NICHOLS, C. M.; HICKS, J. M. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. **The Journal of American Dental Association**. v.129, p. 187-94, 1998.

JONES, R.D.; JAMPANI, H.B.; NEWMAN, J.L.; LEE, A.S. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. **American Journal of Infection Control**, v.28, n.2, p.184-196, April, 2000.

JUNQUEIRA, J.C. et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. **BMC Microbiology**, v. 11 n. 247, p.2-9, 2011.

KHAN, A. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. **FEMS Yeast Research**. v. 11, p.114–122, 2011.

KOGA-ITO, C.Y.; LYON, J.P.; VIDOTTO, V.; DE RESENDE, M.A. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v.161, p. 219-223, 2006.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.2, p.197-201, Abr./Jun., 2006.

LORETO, E.S. *Candida dubliniensis*: Epidemiologia, procedimentos de identificação, aspectos de suscetibilidade e virulência. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

MAEKAWA, L.E. et al. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara. v. 39, n.1, p. 15-19, Jan./fev. 2010.

MARCO-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complementary and alternative Medicine**, v.11, p.119, 2011.

MARINHO, A.S. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre cultura de *Candida sp.* e de células epiteliais: estudo in vitro. 2006 Tese (Doutorado em Odontologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MARSCH, P.; MARTIM, M.V. Microbiologia Oral. 4ª edição São Paulo: Editora Santos, p. 153-162, 2005.

MARTINEZ, M. et al. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3135-3139, 2002.

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. **International Journal of Maxillofacial Surgery**, v.25, p.136-144, 1996.

MISHRA, N.N. et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species- a review. **Acta Microbiológica et Immunologica Hungarica**. v.54, n.3, p.201-235, 2007.

MOLINA, F.P. et al. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. *Ciencias Odontológicas Brasileiras*. v.11, n. 2, p.86-93, abr./jun., 2008.

MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis* : Why Is *C. albicans* More Pathogenic? **International Journal of Microbiology**, p.1-7, 2012.

MOREIRA, A.C.A. et al. Avaliação In vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**., Salvador, v.8, n.2, p.153-161, mai/ago. 2009.

NATEKAR, P.E; SOUZA, F.M. Cetrimide – An antifungal agent for preservation of dissected cadavers in tanks. **Anatomica Karnataka**, v.6, n.2, p.5-7, 2012.

NEVILLE, B.W. et al. Patologia oral e maxilofacial. 2ª ed. Rio de Janeiro : Editora Guanabara, p. 183-192, 2004.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.519–523, 2007.

OBAIDAT, R. M. et al.: Preparation of Mucoadhesive Oral Patches Containing Tetracycline Hydrochloride and Carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis. **Scientia Pharmaceutica.**, v. 79, p.197–212, 2011.

ODDS, F.C.; VAN NUFFEL, L.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 36, p.2869-2873, 1998.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3-S13, 2012.

PARASKEVAS, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. **International Journal of Dental Hygiene.**, v.3, p. 162-178, 2005.

PATEL, M.; MEDTECH, J.A.S.; COOGAN, M.M; GALPIN,J. Antifungal effect of mouth rinses on oral *Candida* counts and salivary flow in the treatment-naïve HIV-infected patients. **AIDS PATIENT CARE and STDs**, v. 22, n. 8, p. 613-618, 2008.

PEREA, S. et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.6, p. 1695 – 1703, 2002.

PEREIRA-CENCI, T. ; DEL BELCURY, A.A.; CRIELAARD, W. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **Journal of Applied Oral Science**. v.16, n. 2, p. 86-94, 2008.

PINJON, E.; MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. **Biochemical Society Transactions**, v.33, n.5, p.1210 – 1214, 2005.

PINTO, E. et al. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.37, p. 587-592, 2008.

PORTILLO-RUIZ, M.C et al. Antifungal Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil on a Wheat Flour-Based Medium. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. M441-445, 2012.

RAMAGE,G. et al. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology** . v.111, p. 456-460, 2011.

REGO, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Effects of environmental stabilization procedures on counts of *Candida spp.* In children. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n. 4, p.332-6, 2003.

ROGERS, T. J.; BALISH, E. Immunity to *Candida albicans*. *Microbiological Reviews*, v.44, p.660–682, 1980.

SANGLARD, D. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. **Drug Resistance Updates**. v.1, p. 255-265, 1998.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v.17, part 2, p.74-77, may 2003.

SANTOS, R.I. et al. Óleo Essencial de *Thymus vulgaris*: Elaboração de Enxaguatório Bucal e Avaliação do Efeito In Vitro na Formação da Placa Bacteriana. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n. 6, p.941-7, 2010.

SCHEID, L.A. Aspectos fenotípicos e perfil de suscetibilidade de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol frente a antifúngicos e associações. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SCHEP, L.J; JONES, D.S ; SHEPHERD, M.G. Primary interactions of three quaternary ammonium compounds with blastospores of *Candida albicans* (MEN Strain) . **Pharmaceutical Research**, v.12, n.5, p.649-652, 1995.

SCHROEDER, H.E.; MARTHALER, T.M.; MUHLEMANN, H.R.; Effects of some potential inhibitors on early calculus formation. **Helvetica Odontologica Acta.**, v. 6, p. 6-9, 1962.

SCHWEIZER, H.P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p.1-7, 2001.

SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Critical reviews in oral Biology and Medicine**. v.5, n.2, p.125-157, 1994.

SENA, M.F et al. Tratamento de candidíase oral em pacientes com cancer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v.53, n. 3, p. 241-245, jul.-set. 2009

SHIM, J-Y; YIM, S-B; CHUNG, J-H; HONG, KS. Antiplaque and antigingivitis effects of a mouthrinse containing cetylpyridinium chloride, triclosan and dipotassium glycyrrhizinate. **Journal of Periodontal & Implant Science.**, v.42, p.33-38, 2012.

SILVA,R.P.R. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. **Revista Brasileira Odontológica**, Rio de Janeiro,v.68, n.1, p.91-4, 2011.

SHRESTHA , A. In vitro antifungal effect of mouth rinses containing clorexidine and thymol. **Journal of Dental Sciences**, v.6, p.1-5, 2011.

SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.329-334, Feb., 1998.

SULLIVAN, D. J. et al. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**. v.17, part. 2, pg. 74-77 may 2003.

SULLIVAN, D. J. et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research** v.4, p. 369-376, 2004.

SULLIVAN,D.J; MORGAN, G.P; COLLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: ten years on. **FEMS Microbiology Letters**. v.253, p.9-17, 2005.

TEN CATE, J.M et al. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **Journal of Dental Research.**, v.88, n. 2, 2009.

THOMAS, E. Efficacy of two commonly available mouth rinses used as preprocedural rinses in children. **Journal of Indian Society of Periodontics and Preventive Dentistry**, v.29, n.2, p.113-116, apr./jun. 2011.

TOBGI, R.S.; SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to clorexidine gluconate. **Journal of Medical and Veterinary Mycol**, v. 25, p. 335-338, 1987.

TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. **Pós-Graduação Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, v.3, n. 2, p. 43-52, jul/dez 2000.

TRABOULSI, R.S.; MUKHERJEE, P.K.; MAHMOUD, A.G. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida spp.* Isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.31, p.272-276, 2008.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 479-527, 2008.

TURK, B.T.; SEN, B.H.; OZTURK, T. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**, v.108, p. 297-301, 2009.

VALE-SILVA , L.A et al. Antifungal activity of the essential oil of thymus x viciosoi against *Candida* , *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Dermatophyte species*. **Planta Medica**, v. 76, p. 882-888, 2010.

VASQUEZ, J.A. Therapeutic options for the management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in HIV/AIDS patients. **HIV Clinical Trials**. v.1, n.1, p.47-59, 2000.

YU, L. et al. *In vitro* interaction between Fluconazole and Triclosan against Clinical Isolates of Fluconazole- Resistant *Candida albicans* Determined by Different Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, July, p.3609-3612, 2011.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. *Introduction t fungi*. Third Edition. Cambridge University Press 2007.

ZHU, W.; FILLER, S.C. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-283, 2010.

ZORE, G.B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18 , p. 1181– 1190, 2011

7 ANEXOS

Tabela 1: CIM de antissépticos sintéticos frente à *C. albicans* sensíveis ao fluconazol

<i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol	Triclosan*	Cloreto de Cetilpiridíneo*	Gluconato de Clorexidina*
1	25	3,12	3,9
2	6,25	6,25	7,8
3	12,5	3,12	3,9
4	25	3,12	7,8
5	25	3,12	3,9
6	25	3,12	3,9
7	25	6,25	3,9
8	25	6,25	7,8
9	12,5	6,25	7,8
10	25	6,25	3,9
11	12,5	3,12	3,9
12	12,5	3,12	3,9
13	12,5	6,25	7,8
14	25	6,25	7,8
15	25	6,25	7,8
16	12,5	3,12	3,9
17	25	6,25	7,8
18	12,5	3,12	1,95
19	6,25	3,12	3,9
20	25	3,12	7,8

* µg/ mL

Tabela 2: CIM de antissépticos naturais frente à *C. albicans* sensíveis ao fluconazol

<i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol	Carvacrol	Eugenol	Timol
1	312,5	625	625
2	312,5	625	312,5
3	312,5	625	312,5
4	312,5	625	312,5
5	312,5	625	312,5
6	312,5	625	312,5
7	312,5	625	312,5
8	312,5	625	625
9	156,2	625	312,5
10	156,2	625	312,5
11	156,2	625	312,5
12	156,2	625	312,5
13	78,2	156,2	78,2
14	156,2	625	312,5
15	312,5	625	312,5
16	156,2	625	156,2
17	156,2	625	312,5
18	312,5	625	312,5
19	156,2	625	312,5
20	156,2	625	312,5

* µg/ mL

Tabela 3: CIM de antissépticos sintéticos frente à *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol	Triclosan	Cloreto de Cetilpiridíneo	Gluconato de Clorexidina
1	12,5	1,56	1,95
2	12,5	1,56	1,95
3	12,5	3,12	7,8
4	12,5	0,78	3,9
5	12,5	1,56	3,9
6	12,5	1,56	3,9
7	25	1,56	3,9
8	12,5	1,56	3,9
9	25	1,56	3,9
10	12,5	0,78	1,95
11	12,5	1,56	3,9
12	6,25	1,56	3,9
13	6,25	0,78	7,8
14	0,78	0,78	0,97
15	12,5	6,25	7,8
16	1,56	0,78	1,95
17	25	6,25	3,9
18	12,5	0,78	7,8
19	12,5	0,78	3,9
20	25	6,25	3,9

* µg/ mL

Tabela 4: CIM de antissépticos naturais frente à *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol	Eugenol	Carvacrol	Timol
1	625	156,25	312,5
2	625	156,25	312,5
3	625	156,25	312,5
4	312,5	156,25	312,5
5	625	156,25	312,5
6	625	625	312,5
7	625	312,5	312,5
8	625	312,5	312,5
9	625	156,25	312,5
10	625	312,5	312,5
11	625	78,12	39,06
12	625	312,5	312,5
13	625	312,5	625
14	625	156,25	156,2
15	625	312,5	312,5
16	625	156,2	156,25
17	625	156,25	312,5
18	625	312,25	312,5
19	625	156,25	312,5
20	625	156,25	312,5

* µg/ mL

Tabela 5: CIM de antissépticos sintéticos frente à *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol	Triclosan	Cloreto de Cetilpiridíneo	Gluconato de Clorexidina
1	12,5	1,56	1,95
2	12,5	3,12	1,95
3	25	6,25	15,6
4	6,25	3,12	1,95
5	6,25	3,12	1,95
6	12,5	6,25	1,95
7	12,5	6,25	1,95
8	25	3,12	3,9
9	25	3,12	3,9
10	12,5	1,56	3,9
11	25	3,12	1,95
12	12,5	3,12	1,95
13	25	1,56	1,95
14	25	6,25	7,8
15	25	6,25	7,8
16	25	3,12	15,6
17	25	3,12	15,6
18	12,5	3,12	1,95
19	25	1,56	1,95
20	25	3,12	3,9

* µg/ mL

Tabela 6: CIM de antissépticos naturais frente à *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol	Carvacrol	Eugenol	Timol
1	312,5	312,5	625
2	156,2	312,5	312,5
3	156,25	312,5	312,5
4	156,2	625	312,5
5	156,2	625	312,5
6	156,2	625	312,5
7	156,2	312,5	156,2
8	156,2	312,5	312,5
9	156,2	312,5	312,5
10	156,2	156,2	156,2
11	156,2	625	312,5
12	78,12	312,5	156,2
13	156,2	312,5	312,5
14	78,12	312,5	312,5
15	156,2	625	312,5
16	156,2	312,5	312,5
17	156,2	312,5	312,5
18	156,2	312,5	312,5
19	156,2	625	312,5
20	156,2	312,5	156,2

* µg/ mL

Tabela 7: CFM de antissépticos sintéticos à *C. albicans* sensíveis ao fluconazol.

<i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol	Triclosan	Cloreto de Cetilpiridíneo	Gluconato de Clorexidina
1	25	25	3,9
2	6,25	25	7,8
3	12,5	6,25	3,9
4	25	3,12	7,8
5	25	6,25	3,9
6	25	3,12	3,9
7	25	6,25	3,9
8	25	6,25	7,8
9	12,5	12,5	7,8
10	50	6,25	3,9
11	12,5	3,12	31,25
12	12,5	3,12	3,9
13	12,5	12,5	7,8
14	25	25	7,8
15	25	6,25	7,8
16	12,5	6,25	3,9
17	25	12,5	7,8
18	50	6,25	31,25
19	6,25	6,25	3,9
20	25	12,5	7,8

* µg/ mL

Tabela 8: CFM de antissépticos naturais frente à *C. albicans* sensíveis ao fluconazol.

<i>C. albicans</i> sensíveis ao fluconazol	Carvacrol	Eugenol	Timol
1	312,5	625	625
2	312,5	625	312,5
3	312,5	625	312,5
4	312,5	1250	312,5
5	312,5	625	625
6	312,5	625	625
7	312,5	1250	625
8	312,5	1250	625
9	312,5	1250	312,5
10	156,2	625	312,5
11	312,5	625	312,5
12	312,5	1250	312,5
13	312,5	625	78,12
14	156,2	625	312,5
15	312,5	625	312,5
16	156,2	625	625
17	312,5	625	312,5
18	312,5	625	312,5
19	156,2	1250	312,5
20	156,2	625	312,5

* µg/ mL

Tabela 9: CFM de antissépticos sintéticos frente à *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol	Triclosan	Cloreto de cetilpiridíneo	Gluconato de Clorexidina
1	12,5	1,56	1,95
2	50	1,56	7,8
3	12,5	6,25	31,25
4	12,5	1,56	3,9
5	12,5	1,56	3,9
6	50	1,56	6,25
7	25	3,12	3,9
8	25	3,12	3,9
9	25	1,56	31,25
10	12,5	1,56	1,95
11	12,5	50	62,5
12	6,25	1,56	3,9
13	25	0,78	7,8
14	1,56	0,78	0,97
15	50	50	500
16	1,56	1,56	3,9
17	25	12,5	31,25
18	12,5	1,56	7,8
19	12,5	1,56	3,9
20	25	25	31,25

* µg/ mL

Tabela 10: CFM de antissépticos naturais frente à *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> sensíveis ao fluconazol	Eugenol	Carvacrol	Timol
1	1250	312,5	312,5
2	1250	312,5	625
3	625	312,5	312,5
4	625	156,2	312,5
5	625	312,5	625
6	1250	625	>625
7	1250	312,5	312,5
8	1250	312,5	312,5
9	2500	312,5	312,5
10	625	312,5	312,5
11	625	312,5	312,5
12	625	312,5	625
13	1250	312,5	625
14	1250	156,2	312,5
15	625	312,5	312,5
16	625	312,5	312,5
17	625	312,5	312,5
18	625	312,5	625
19	1250	312,5	625
20	1250	312,5	625

* µg/ mL

Tabela 11: CFM antissépticos sintéticos frente à *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol	Triclosan	Cloreto de Cetilpiridíneo	Gluconato de Clorexidina
1	12,5	1,56	3,9
2	25	3,12	1,95
3	25	25	31,25
4	12,5	3,12	1,95
5	6,25	3,12	1,95
6	12,5	6,25	3,9
7	12,5	6,25	1,95
8	25	6,25	250
9	50	6,25	62,5
10	12,5	6,25	7,8
11	25	3,12	1,95
12	12,5	6,25	7,8
13	25	3,12	1,95
14	25	6,25	7,8
15	25	12,5	7,8
16	25	3,12	250
17	25	6,25	1,95
18	25	6,25	1,95
19	25	3,12	7,8
20	12,5	6,25	3,9

* µg/ mL

Tabela 12: CFM de antissépticos naturais frente à *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol.

<i>C. dubliniensis</i> resistentes ao fluconazol	Carvacrol	Eugenol	Timol
1	625	625	625
2	156,25	625	312,5
3	312,5	625	312,5
4	312,5	1250	312,5
5	312,5	625	312,5
6	312,5	625	312,5
7	156,25	625	312,5
8	156,25	312,5	625
9	156,25	2500	625
10	156,25	312,5	312,5
11	156,25	625	312,5
12	156,25	625	312,5
13	156,25	625	312,5
14	156,25	625	312,5
15	312,5	625	625
16	156,25	312,5	625
17	312,5	625	625
18	312,5	625	625
19	156,25	625	312,5
20	312,5	312,5	312,5

* µg/ mL