

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

Octávio Couto Moreira

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS NA
CAVIDADE BUCAL SOBRE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Octávio Couto Moreira

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS NA CAVIDADE BUCAL SOBRE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Sydney Hartz Alves

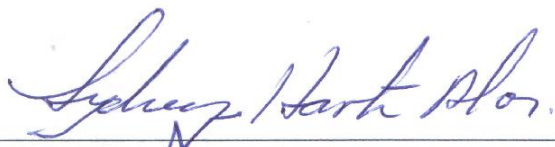
Santa Maria, RS, Brasil.
2016

Octávio Couto Moreira

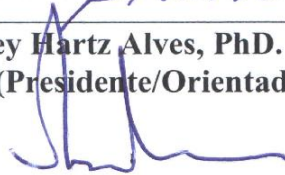
AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS NA CAVIDADE BUCAL SOBRE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 21 de março de 2016:



Sydney Hartz Alves, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Paulo Edelvar Correa Peres, Dr. (UFSM)



Érico Silva de Loreto, PhD. (SOBRESP)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Otavio Pinto Moreira e Sônia Maria Couto Moreira, meus irmãos Pedro Couto Moreira e Rodrigo Couto Moreira, a minha esposa Liziane Maria Maffini Moreira e a minha filha Luiza Maffini Moreira, que sempre me incentivaram em todos os momentos com o máximo de amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar esse sonho.

A minha família, em especial a minha esposa Liziane Maria Maffini Moreira e minha filha Luiza Maffini Moreira, por todo seu amor, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos me ajudando, incentivando e acreditando em meu trabalho, para o nosso progresso. Aos meus sogros Almeri Maffini e Inês da Rosa Maffini que sempre me incentivaram e me ajudaram.

Ao meu orientador Professor Doutor Sydney Hartz Alves, que com sua imensa bondade, apresentou-me esse mundo maravilhoso da pesquisa, abrindo as portas do conhecimento e da esperança de dias melhores através do estudo e da educação.

A colega e amiga Doutoranda Laura Bedin Denardi, por sua paciência e dedicação, ajudando-me com seus ensinamentos, me “co-orientando” na pesquisa prática e teórica.

A todos os colegas e amigos do LAPEMI, que me proporcionaram bons momentos de amizade, companheirismo e troca de informações.

À Faculdade Integrada de Santa Maria – FISMA, por ter me concedido afastamento, para fazer essa pós-graduação.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilidade e informações oferecidas.

A CAPES pela bolsa de estudos, proporcionando o apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo”.

(Chico Xavier)

RESUMO

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS NA CAVIDADE BUCAL SOBRE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL

AUTOR: OCTÁVIO COUTO MOREIRA
ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES

As candidíases da orofaringe revelam-se desafiadoras no contexto clínico dos pacientes imunocomprometidos, quer pela sua morbidade, quer pelas dificuldades no tratamento. Pacientes com AIDS, com câncer, transplantados estão entre os mais atingidos. Tradicionalmente *C. albicans* é o principal agente, todavia outras espécies como *C. glabrata* e *C. dubliniensis* manifestam, com frequência, a emergência do fenômeno da resistência, sobretudo aos antifúngicos azólicos como o fluconazol. Os antissépticos bucais assim como o antifúngico poliênico nistatina, têm sido recomendados como agentes auxiliares na redução da carga bacteriana e fúngica destes pacientes, concorrendo para assegurar o sucesso da terapêutica antifúngica instituída. No presente estudo avaliou-se a suscetibilidade de trinta isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol e trinta isolados resistentes ao fluconazol, frente aos antissépticos cloreto de cetilpiridínio, triclosan, clorhexidina e ao antifúngico poliênico nistatina. Os ensaios foram realizados através de testes de microdiluição em caldo, de acordo com metodologia descrita no documento M27-A3 (CLSI, 2008). A verificação das concentrações inibitórias mínimas destes compostos frente aos isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol não evidenciou diferenças significativas na suscetibilidade entre os dois grupos. Quando avaliou-se a atividade fungicida, foram evidenciadas diferenças significativas entre as concentrações fungicidas mínimas de cloreto de cetilpiridínio, triclosan e a nistatina. No entanto, frente à clorhexidina, o grupo de leveduras resistente ao fluconazol foi mais sensível do que o grupo fluconazol-sensível. Os autores discutem estes achados, propondo que novas abordagens devem ser realizadas, sobretudo envolvendo isolados de *C. glabrata* resistentes às equinocandinas bem como a capacidade de *C. glabrata* desenvolver resistência aos próprios antissépticos. Estudos envolvendo biofilmes de *C. glabrata* deverão também ser avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida glabrata*, Resistência Antifúngica, Antimicrobianos, Enxaguatórios bucais.

ABSTRACT

***IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN ORAL HOLLOW ON *Candida glabrata* SENSITIVE AND RESISTANT FLUCONAZOL**

AUTHOR: OCTÁVIO COUTO MOREIRA
SUPERVISOR: SYDNEY HARTZ ALVES

Oropharyngeal candidiasis is a challenging fungal disease in the clinical setting of immunocompromised patients, either by their morbidity or by its difficulties in treatment. Patients with AIDS, cancer, and transplanted are among the more affected. Traditionally *C. albicans* is the main agent of the oropharyngeal candidoasis, but other species such as *C. glabrata* and *C. dubliniensis* often show the emergence of resistance phenomenon, especially to azole antifungals agents such as fluconazole. The antiseptic mouthwashes as well as antifungal polyene nystatin, have been recommended as auxiliary agents in reducing the bacterial and fungal load of these patients, contributing to ensure the success of antifungal therapy instituted. In the present study we evaluated the susceptibility of 30 isolates of *C. glabrata* sensitive to fluconazole and 30 isolates of this species, but resistant to fluconazole against the antiseptic cetylpyridinium chloride, triclosan, chlorhexidine and antifungal polyene nystatin. Assays were carried out through microdilution tests according to the methodology described in document M27-A3 (CLSI, 2008). Comparisons of minimum inhibitory concentrations (MICs) between sensitive and resistant isolates to fluconazole did not show significant differences in susceptibility. On the other hand when it was evaluated the fungicidal activity assays, the minimum fungicidal concentrations (MFCs) showed no significant differences among the CFMs for the cetylpyridinium chloride, triclosan and nystatin. However, to chlorhexidine, the group of yeast resistant to fluconazole was significantly more sensitive to the fungicidal concentrations of antiseptic than fluconazole-sensitive group. The authors discuss these findings, proposing that new approaches must be taken, especially involving isolates of *C. glabrata* resistant to echinocandins and *C. glabrata* ability to develop resistance to antiseptics own. Studies evolving *C. glabrata* biofilms should also be assessed.

KEYWORDS: *Candida glabrata*, Antifungal resistance, antimicrobials, oral rinses.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 – Faixa de concentração testada para cada fármaco.	33
Tabela 1 – Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> de <i>C. glabrata</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol frente à nistatina e compostos antissépticos triclosan, cloreto de cetilpiridínio e clorexidina.	42
Tabela 2 – Atividade fungicida ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> de <i>C. glabrata</i> sensíveis e resistentes ao fluconazol frente à nistatina e compostos antissépticos triclosan, cloreto de cetilpiridínio e clorexidina.	43

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	11
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.1.1 O GÊNERO <i>Candida</i>	13
1.1.2 Candidíases	14
1.1.2.1 Candidíase Oral	16
1.1.2.2 Candidíase Pseudomembranosa, Candidíase Atrófica Crônica e Queilite Angular ..	16
1.1.3 <i>Candida glabrata</i>	17
1.1.4 Enxaguatórios bucais	22
1.1.4.1 Antissépticos bucais	23
1.1.4.1.1 Cloreto de cetilperidínio	23
1.1.4.1.2 Gluconato de clorexidina	24
1.1.4.1.3 Triclosan	26
1.1.4.1.4 Nistatina	28
1.2 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS	30
1.2.1 PROPOSIÇÃO	30
1.2.2 OBJETIVOS	31
1.2.2.1 Objetivo Geral	31
1.2.2.2 Objetivos Específicos	31
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
1.3.1 Micro-organismos	31
1.3.2 Agentes antifúngicos	32
1.3.3 Indução da resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>	32
1.3.4 Testes de suscetibilidade	33
1.3.4.1 Preparação do inóculo	33
1.3.4.2 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)	33
1.3.4.3 Determinação das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs)	34
2 ARTIGOS	35
2.1 Artigo nº 1	35
3 DISCUSSÃO	46
4 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. APRESENTAÇÃO

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 patogênicos 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).

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 imunocomprometidos e traz como principais características a elevação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antifúngicos, menores índices de sucesso terapêutico, recorrência das infecções e, de forma mais grave, maiores índices de mortalidade (JABRA-RIZK et al., 2004).

As candidíases se constituem na principal micose oportunista comprometendo pacientes severamente imunocomprometidos como os transplantados de medula óssea, pacientes com câncer, submetidos a grandes procedimentos cirúrgicos, pacientes com AIDS (LODI et al., 2007).

O gênero *Candida* conta com aproximadamente duzentas espécies e apenas um número relativamente pequeno delas apresenta importância clínica em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (BOW, 2009; ZOMORODIAN et al., 2011). Cerca de 80% dos indivíduos saudáveis apresentam colonização por uma ou mais espécies de *Candida*. *C. albicans* representa metade a dois terços das leveduras isoladas em humanos e é responsável pela maioria dos casos de candidíase bucal e sistêmica (BOW, 2009).

A colonização assintomática por *Candida* spp. pode ocorrer inclusive em pacientes sob terapia antifúngica (LODI et al., 2007). O aumento da carga de *Candida* spp. determinada pela quantificação de unidades formadoras de colônias na saliva (UFC/mL) foi sugerido como um parâmetro para identificação de infecção por *Candida* spp. (EPSTEIN et al., 1980), mas não há consenso quanto a definição de um valor limite que caracterize colonização ou infecção. Por outro lado, foram descritos valores elevados de UFC/mL em pacientes assintomáticos (BUDTZ-JÖRGENSEN et al., 1981; OLIVER & SHILLITOE, 1984).

C. glabrata tem emergido em muitos países como 2° ou 3° agente mais isolado em episódios de candidíase (PFALLER & DIEKEMA, 2007; PERLROTH et al., 2007; SANDVEN et al., 2000). A incidência de *C. glabrata* tem aumentado nas candidemias desde 1993; todavia, este aumento tem sido geograficamente determinado. De modo geral, na América do Norte e Europa, *C. glabrata* se impõe como a 2° espécie mais envolvida em candidíases, muitas delas com risco de morte (TRICK et al., 2002).

No Brasil, Colombo et al. (2006) avaliando a etiologia das candidemias em 11 centros médicos brasileiros, evidenciaram que *C. glabrata* ocupa o 5° lugar (4,9%) entre os agentes de candidemias. Em compensação, tal percentual corresponde a 0,12 casos/1000 o que é similar aos países europeus e América do Norte. Assim, os percentuais brasileiros são mais baixos em função de que as candidemias no Brasil (2,49 casos/1000) são até 15 vezes mais frequentes do que nos Estados Unidos. Neste contexto, *C. glabrata* passa a ter destaque no cenário da Infectologia Brasileira, onde as questões referentes a tratamentos podem ser complexas, temerárias e com desfechos fatais.

C. glabrata se caracteriza por evidenciar menor susceptibilidade frente ao fluconazol, sendo primariamente menos sensível a este azólico e a anfotericina B do que outras espécies de *Candida*. Ao mesmo tempo, *C. glabrata* evidencia capacidade de rapidamente tornar-se resistente ao fluconazol e, cruzadamente, aos demais azólicos do que outras espécies de *Candida* (PFALLER & DIEKEMA, 2007; WARNOCK, 2007).

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 faz crescer o interesse pela pesquisa de novas estratégias terapêuticas (VALE-SILVA et al., 2010; GARG & SINGH, 2011).

No contexto das candidíases bucais, os enxaguatórios constituem-se em tradicional método auxiliar para a remoção dos biofilmes orais, pois são uma alternativa para a veiculação de substâncias antifúngicas, uma vez que atuam inviabilizando a colonização das superfícies do hospedeiro. Busca-se com os 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). Recentemente, com as indicações de equinocandinas para tratamento das candidíases invasivas, *C. glabrata* passou a evidenciar taxas crescentes de resistência a esta nova classe de antifúngicos. Isolados de *C. glabrata* manifestando resistência aos azólicos e equinocandinas, simultaneamente, tem sido cada vez mais frequentemente isolados. Diante deste novo panorama, é fundamental o monitoramento da

suscetibilidade aos antifúngicos nesta espécie, sobretudo em situações que sinalizam para o estabelecimento de candidíases em pacientes imunocomprometidos (ARENDRUP et al., 2014).

A suscetibilidade de *C. glabrata* aos enxaguatórios bucais não tem sido estudada, mas requer atenção devido à facilidade com que *C. glabrata* manifesta alterações de suscetibilidade (ARENDRUP et al., 2014). Por conseguinte, é prudente e racional investigar a suscetibilidade desta espécie frente a substâncias tradicionalmente utilizadas como enxaguatórios bucais objetivando-se comprovar a atividade antifúngica de compostos sintéticos (gluconato de clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, nistatina e triclosan) sobre isolados de *C. glabrata*, sensíveis e resistentes ao fluconazol reduzindo desta forma, a ocorrência das infecções oportunistas através da manutenção do equilíbrio da microbiota bucal.

1.1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 O GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Hemiaslomyces*, ordem *Saccharomycetales* e família *Cryptococaceae* (WEBSTER & WEBER, 2007). Este gênero compreende mais de 200 espécies, das quais aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos (CHAVES et al., 2003).

A primeira documentação de leveduras do gênero *Candida* como patógeno foi em 1839, quando Langenbeck observou e isolou da cavidade oral de um paciente com afta bucal, uma levedura que hoje conhecemos como *C. albicans* (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Os fungos do gênero *Candida* constituem-se em células leveduriformes, gram-positivas, com morfologia globosa ou ovalada com diâmetro de 3 a 6 μm , e que podem formar brotamentos e pseudohifas. As colônias deste gênero evidenciam crescimento rápido a 35°C; no Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) elas se apresentam na cor branco-amarelada e de aspecto cremoso (JOKLIK et al., 1995).

Cerca de 80% dos indivíduos saudáveis apresentam colonização por uma ou mais espécies de *Candida*. *C. albicans* representa metade a dois terços das leveduras isoladas em humanos e é responsável pela maioria dos casos de candidíase bucal e sistêmica (BOW, 2009). É dimórfica, sendo uma das poucas espécies capazes de produzir hifas verdadeiras.

Apesar da semelhança morfológica entre as espécies, *C. albicans* é um patógeno com maior habilidade para se adaptar a ambientes desfavoráveis (MCMANUS & COLEMAN, 2013).

Candida spp. compõe a maioria dos agentes leveduriformes emergentes que são patogênicos ao homem. As espécies deste gênero fazem parte da microbiota normal humana do trato gastrointestinal, geniturinário e pele humana. Passam da forma comensal para a forma patogênica quando há alterações na imunidade do hospedeiro decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância, do envelhecimento, ou ainda mais frequente nas doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênita ou adquirida. Outros fatores que também contribuem para a infecção por *Candida* é o rompimento de barreiras mucocutâneas bem como na disfunção dos neutrófilos, desordens metabólicas, transplantes, e durante quimioterapia antineoplásica. O crescente número de pacientes imunocomprometidos tem determinado um crescimento das infecções fúngicas causado por fungos oportunistas, em especial candidíase oral e sistêmica (SCHUMAN et al., 1998; BALKIS et al., 2002; BODEY et al., 2002; TRICK et al., 2002; PFALLER & DIEKEMA, 2007; COLOMBO et al., 2003).

1.1.2 Candidíases

No período compreendido entre 1930-1940, as doenças do homem associadas a espécies de *Candida* eram bem raras, e as candidíases profundas eram praticamente desconhecidas. Na atualidade, a candidíase superficial está entre as infecções mais comuns da pele e mucosas, e tanto as candidíases superficiais como as profundas podem ser considerados como problemas de saúde pública (ZAITZ et al., 1998).

As infecções por *Candida* spp. podem se manifestar de formas brandas ou graves. As manifestações mais leves atingem a superfície cutânea ou membranas mucosas, caracterizada por manchas brancas na boca, vulvovaginites com prurido e corrimento, forma ungueal e periungueal com perda ou espessamento das unhas, forma intertriginosa e a paroníquia. As formas sistêmicas são infecções graves como septicemia, meningite, endocardite, pneumonias e lesões ulcerativas no esôfago. (LACAZ et al., 2002).

A incidência de candidíase oral teve substancial aumento durante as últimas décadas devido ao crescimento de pacientes imunocomprometidos, em particular em indivíduos portadores do HIV. Considera-se que os indivíduos portadores do vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea. Além disso, tem se observado uma tendência ao aumento no número de infecções relacionadas com as espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (RUHNKE et al., 1994; RUHNKE et al., 2000). Esse fato

se deve, em parte, ao avanço e aprimoramento das técnicas de identificação micológicas, número crescente de pacientes imunocomprometidos e, em paralelo, ao aumento de patógenos que emergiram como oportunistas (ARRAES, 2012).

As espécies de *Candida* são ubíquas e os fungos mais comuns que afetam os seres humanos. *Candida* spp. são agentes oportunistas que desafiam os recentes avanços tecnológicos para ter acesso à circulação vascular e aos tecidos profundos; atacam pacientes de alto risco que estão também imunocomprometidos ou criticamente doentes (HOSPENTHAL & RINALDI, 2008).

Os extremos de idade 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, os agentes antimicrobianas de amplo espectro têm, como resultado de sua ação, a supressão da microbiota bacteriana endógena e a eliminação das bactérias competidoras, favorecendo, dessa forma, o supercrescimento das espécies de *Candida* (AKPAN & MORGAN, 2002). Além disso, sabe-se que outros fármacos 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).

A candidemia é observada, em particular, em pacientes hospitalizados submetidos a terapias antimicrobianas por um longo período de tempo a procedimentos invasivos ou terapia imunossupressora (SIDRIM & ROCHA, 2004). Em hospitais terciários, as infecções por *Candida* spp. respondem por cerca de 80% das infecções fúngicas e, devido a alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, têm grande importância no cenário hospitalar. Representam importante desafio aos clínicos devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas, além do alto custo do tratamento e altas taxas de mortalidade (COLOMBO et al., 2003; COLOMBO et al., 2006).

1.1.2.1 Candidíase Oral

Micose que atinge a superfície cutânea e ou membranas mucosas, resultando em candidíase oral, a forma mais comum é a pseudomembranosa, caracterizada por placas brancas removíveis na mucosa oral (aftas), é denominada candidíase ou candidose a infecção bucal causada por micro-organismo fúngico semelhante à levedura, como por exemplo, a *C. albicans*. A espécie *C. albicans* é um componente normal da microbiota bucal podendo existir em harmonia sem apresentar sinais de infecção (NEVILLE et al., 2004)

A candidíase oral é frequente entre os recém-nascidos, em adultos diabéticos, debilitados, ou naquele submetidos à má adaptação de próteses dentárias; pode também se constituir num indicador de AIDS. A infecção oral pode propagar-se a faringe, a laringe, ao esôfago e disseminar-se por via hematogênica (ZAITZ et al., 1998).

Sabe-se, no entanto, que a maior parte das manifestações da candidose oral relaciona-se a 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; TEN CATE et al., 2009; RAMAGE et al., 2011). Assim como outros fungos patogênicos, a maioria das espécies do gênero *Candida* podem existir sob duas formas: como levedura que é uma forma inócua; ou como hifas que está associada a invasão de tecidos. A esta característica de existência em duas formas dá-se o nome de dimorfismo (NEVILLE et al., 2004).

1.1.2.2 Candidíase Pseudomembranosa, Candidíase Atrófica Crônica e Queilite Angular.

A candidíase pseudomembranosa tem se apresentado, classicamente, como infecção aguda, embora o termo crônica tenha sido utilizado para indicar casos de reincidência. É comum encontrá-la em extremos de idade, pacientes imunocomprometidos especialmente em casos de AIDS, diabéticos, pacientes fazendo uso de corticosteroides e ou antibióticos de amplo espectro, bem como em outras malignidades. Apresentam-se na superfície oral, como

placas de cor branca a amarelo-esbranquiado cremosas, confluentes com coalhada de leite, as superfícies orais envolvidas incluem a mucosa labial, língua, palato duro e mole e orofaringe. Os sintomas da forma aguda são bem leves, podendo os pacientes apenas queixar-se de um formigamento ou mau gosto; as formas crônicas podem envolver a mucosa do esôfago, causando dores de disfagia e no peito (PATIL et al., 2015).

Candidíase atrófica crônica ou estomatite de dentadura é uma inflamação crônica da mucosa, normalmente restringida à área de prótese-rolamento, é encontrada em 50-65% dos usuários de dentadura. As lesões apresentam-se como hiperemia pontual, do tipo eritematoso ou granular, geralmente essas lesões são assintomáticas, porém ocasionalmente os pacientes podem queixar-se de sensação de queimação ou dor, pode afetar o paladar e a mucosa mandibular. A candidíase atrófica está associada à má higiene bucal, desgaste noturno da dentadura, prótese mal ajustada e diminuição do fluxo de saliva sob a superfície da dentadura (PATIL et al., 2015).

Queilite angular é uma forma de candidíase que geralmente se manifesta como fissuras eritematosas ou ulceradas, muitas vezes ela representa uma infecção oportunista causada por fungos ou bactérias, com vários fatores locais e sistêmicos envolvidos na iniciação e persistência da lesão. Os fatores associados incluem a idade avançada e usuários de próteses, deficiência de vitamina B12 e anemia ferropriva (PATIL et al., 2015).

A maioria das lesões dessas formas clínicas, citadas, de candidíase oral, normalmente as espécies de *Candida* isoladas são a *C. albicans*, seguido por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, entre outras espécies de *Candida* não *albicans*, que geralmente o aumento é determinado pela patologia do paciente, por exemplo, em casos de HIV positivo há relatos de aumento da *C. glabrata*, seguido por *C. krusei*, em pacientes com diabétes mellitus observa-se *C. dubliniensis* e *C. glabrata*. No caso da infecção oportunista queilite angular, pode ser causada por fungos ou outros organismos causadores envolvidos como *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PATIL et al., 2015).

1.1.3 *Candida glabrata*

C. glabrata foi inicialmente classificada como *Cryptococcus glabratus* (1917) e posteriormente reclassificada em *Torulopsis glabrata* (1938), devido a seus blastoconídios não produzirem pseudohifas. Posteriormente, foi observado que *C. glabrata* é capaz de formar pseudohifas em ágar contendo baixa concentração de amônia, porém, esta característica não foi considerada como um fator de confiança para diferenciar o gênero *Torulopsis*. Nesta

ocasião a espécie foi novamente classificada no gênero *Candida* (CSANK & HAYNES, 2000). *C. glabrata* não apresenta dimorfismo, ou seja, não se diferencia do estado comensal para o estado patogênico; esta é uma característica que a distingue das demais espécies, pois, em ambos os estados ela se apresenta na forma de blastoconídeos que possuem de 1 a 4 µm (GUBBINS & ANAISSIE, 2002).

C. glabrata e *Saccharomyces cerevisiae* se originaram a partir de um ancestral comum. A maioria dos genes de *S. cerevisiae* tem ontólogos em *C. glabrata*, no entanto, existem diferenças no conteúdo genético. *C. glabrata* perdeu os genes necessários para assimilação da galactose, fosfato, nitrogênio, capacidade de metabolizar o enxofre, tiamina, ácido nicotínico e piridoxina (DUJON et al., 2004). Semelhante ao *S. cerevisiae*, *C. glabrata* é uma levedura *petite*-positivo, o que a difere das demais espécies de *Candida*. Entretanto, *C. glabrata* é um micro-organismo estritamente haplóide e assexuado, diferindo do *S. cerevisiae*. (BIALKOVÁ & SUBIK, 2006).

A identificação desta espécie pode ser realizada por métodos microbiológicos e bioquímicos e, mais recentemente, por métodos imunológicos e moleculares. Em CHROMagar™ *C. glabrata* apresenta coloração púrpura; outra característica fenotípica é a capacidade de assimilar somente os açúcares trealose e glicose, diferindo de outras espécies que assimilam a maioria dos açúcares (BAUMGARTNER et al., 1996; BOUCHARA, et al., 1996). Em ASD, *C. glabrata* forma colônias brilhantes, lisas de coloração creme, que são indistinguíveis das outras espécies de *Candida*. Morfologicamente, evidencia dimensões menores (1-4µm) do que outras espécies como *C. albicans* (4-6 µm), *C. tropicalis* (4-8µm), podendo ser bastante pequena se comparado com outras espécies de *Candida* (RODRIGUES, SILVA, HENRIQUES; 2013).

Durante as últimas décadas, *Candida glabrata* emergiu de levedura não patogênica saprófita da microbiota normal de pacientes saudáveis, para um importante patógeno humano de difícil tratamento, sendo a espécie mais prevalente depois de *Candida albicans* (PFALLER, 2007). A frequência de *C. glabrata* aumentou significativamente para 15-20% de todas as infecções por *Candida*; tal fato pode ser devido a um decréscimo nas infecções por *C. albicans* e diagnósticos mais sensíveis (RUAN et al., 2009). Estudos recentes sugerem que o aumento significativo de fungemias, causadas por espécies de *Candida* não *albicans*, está sendo associado ao aumento de *C. glabrata*, e a incidência tem sido maior em adultos do que em crianças. *C. glabrata* tem sido uma preocupação crescente em ambientes clínicos, onde provoca infecções da mucosa e está relacionada com cerca de 15% de todos os casos de infecções sistêmicas relacionadas a *Candida* (RODRIGUES, SILVA, HENRIQUES; 2013).

Existem mais de 100 espécies de *Candida* reconhecidas como causadores de doença em seres humanos. *C. glabrata* e *C. albicans* são responsáveis por 70% a 80% dos isolados de leveduras a partir de pacientes com candidíase invasiva. *C. glabrata* tornou-se importante devido a sua incidência crescente em todo o mundo e porque é intrinsecamente menos sensível a antifúngicos azólicos e anfotericina B. (HOSPENTHAL & RINALDI, 2008).

As infecções por *C. glabrata* são mais difíceis de tratar e muitas vezes são resistentes aos antifúngicos usados na clínica, por isso evidenciam altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados em situações de risco como internação em UTI, cirurgia abdominal, insuficiência renal, e o tratamento prévio com fluconazol (SOBEL et al., 2000; COLOMBO et al., 2006; TUMBARELLO et al., 2008).

Isolados de *C. glabrata* têm demonstrado reduzida sensibilidade e conseqüentemente um aumento na resistência aos antifúngicos azólicos em especial ao fluconazol. A avaliação de diferentes relatos de casos mostra que 10% dos isolados hematogênicos apresentam resistência ao fluconazol (SAFRAN et al., 1997). A exposição de *C. glabrata* a sub-doses de fluconazol pode resultar em resistência. Estudos clínicos têm mostrado que a frequência de colonização e infecção de pacientes com *C. glabrata* pode ser aumentada em populações submetidas à profilaxia com fluconazol (BENNETT et al., 2004)

Comparando-se com outras espécies de *Candida*, os isolados de *C. glabrata* tendem a apresentar as maiores concentrações inibitórias mínimas (CIMs) quando testadas frente a azóis e também aos demais agentes antifúngicos, incluindo a anfotericina B. As CIMs de fluconazol para *C. glabrata* são aproximadamente 16 vezes maiores que para *C. albicans*, representando assim uma seleção de espécies durante o uso profilático do fluconazol (ZEPELIN et al., 2007; GARNACCHO-MONTERO et al., 2010).

Estudos de suscetibilidade de *C. glabrata* demonstraram que, primariamente, 61,9% dos isolados são sensíveis ao fluconazol e 75,2% são sensíveis à anfotericina B. Tais percentuais são, todavia, ilusórios, pois, embora inicialmente sensíveis, os tratamentos rapidamente revertem o perfil de sensível para resistente (PFALLER et al., 2004).

A resistência de *C. glabrata* aos antifúngicos pode ser inata quando é evidenciada mesmo que o fungo nunca tenha entrado em contato com o agente antimicrobiano, ou adquirida, quando os micro-organismos inicialmente sensíveis a um antimicrobiano se tornam resistentes após a exposição frequente (BENNETT et al., 2004). A resistência de *C. glabrata* aos azólicos pode ser explicada por diferentes mecanismos, incluindo a super-expressão ou mutação de genes que codificam a lanosterol 14 α -desmetilase, o que afeta a biossíntese do ergosterol. As bombas de efluxo são outro mecanismo importantíssimo na determinação da

resistência de *C. glabrata* aos azólicos (GULSHAN et al., 2008). *C. glabrata* ainda é capaz de sintetizar ergosterol a partir do colesterol quando a biossíntese de ergosterol é bloqueada após a supressão do gene ERG11 que codifica a lanosterol 14 α -desmetilase e do gene ERG9, que codifica a esqualenosintase (NAKAYAMA et al., 2001). Experimentos *in vivo* demonstraram que *C. glabrata* acumula precursores anormais de ergosterol diferentes dos acumulados por *C. albicans* (KELLY et al., 1995).

Muitos investigadores consideram que *C. glabrata* funciona como um espectador inocente, pois a terapêutica antifúngica está voltada a *C. albicans*, por ser a levedura mais patogênica e, epidemiologicamente, mais frequente em todas as manifestações clínicas. Durante os tratamentos com azólicos, extingue-se *C. albicans*, mas *C. glabrata* é selecionada e passa a ocupar os espaços deixados por *C. albicans*. *C. glabrata* é ocasionalmente encontrada como única espécie clínica isolada em pacientes com AIDS com candidíase orofaríngea sintomática (SOBEL et al., 1999).

C. glabrata emergiu como um importante patógeno a partir da década de 1990, coincidindo com a utilização do fluconazol como antifúngico de primeira escolha. Anteriormente este organismo recebeu pouca atenção e foi largamente ignorado. Atualmente dispõe-se de ferramentas moleculares para estudar a epidemiologia da *C. glabrata*, e as investigações são necessárias, pois, cada vez mais, esta espécie vem sendo reconhecida como um grave problema nas candidíases superficiais e sistêmicas (ARENDRUP et al., 2014).

Geralmente as espécies de *Candida* são sensíveis às equinocandinas. A exceção, conhecida desde a entrada desta classe na antifungoterapia, é o Complexo parapsilosis, constituído pelas espécies: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, bem como a espécie *C. guilliermondii*. Todas estas espécies evidenciam elevados valores de CIM às equinocandinas, por isto, o documento M27-S4 alterou os breakpoints para estas espécies estabelecendo que concentrações iguais ou superiores a 8,0 $\mu\text{g/ml}$ é compatível com resistência. A natural reduzida suscetibilidade de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* tem impacto ainda obscuro na antifungoterapia, porque estas espécies respondem bem aos tratamentos embora variações entre os pacientes tenha sido detectada (PERLIN, 2014).

Historicamente, desde o primeiro relato de *Candida* spp resistente a equinocandinas em 2005, os isolados classificados como resistentes têm aumentado bastante; todavia, a frequência de isolados equinocandina-resistentes permanecça baixa (2 a 3%) entre a maioria das espécies (PERLIN, 2014).

C. glabrata é uma exceção ao quadro acima descrito porque a resistência as equinocandinas está crescendo rapidamente. Em muitos centros hospitalares o crescente uso de azólicos e de equinocandinas na profilaxia das candidemias, resultou na seleção desta espécie com perfil de suscetibilidade ameaçador. *C. glabrata* despontou como uma importante espécie de *Candida* após a introdução dos antifúngicos triazólicos na década de 1990, uma vez que esta espécie tem mecanismos que a tornam menos sensível a esta classe. Atualmente, a sensibilidade geral apontou para o sucesso das equinocandinas, todavia, frente a *C. glabrata*, o panorama de resistência é sombrio. Tal panorama torna-se mais ameaçador na medida em que se tem constatado isolados de *C. glabrata* azol-resistentes e que pelo tratamento com equinocandinas tornam-se, ao mesmo tempo, resistentes as equinocandinas. Neste contexto, entende-se a epidemiologia das candidemias onde, após *C. albicans*, *C. glabrata* é o patógenos mais frequente na Europa e América do Norte (PERLIN, 2014).

A resistência às equinocandinas pode ocorrer depois de prolongada terapia ou isto pode ocorrer rapidamente já no início do tratamento. Um programa de monitoramento da suscetibilidade de *Candida*, chamado “SENTRY” e desenvolvido nos Estados Unidos registrou que entre 8,0 a 9,3% de *C. glabrata* isolados da corrente sanguínea são resistentes as equinocandinas. Num outro estudo desenvolvido durante dez anos e envolvendo 293 episódios de infecções por *C. glabrata* a resistência saltou do patamar de 2-3% entre 2001-2006 para mais que 13% entre os anos 2009-2010. Mais alarmante ainda, é o fato de que estes isolados equinocandina-resistentes são, ao mesmo tempo, resistentes a antifúngicos azólicos, no que se convencionou chamar de resistência múltipla (PERLIN, 2014).

O fenômeno da resistência adquirida é bem caracterizado quando envolve CIM elevadas, acompanhado de falha terapêutica e comprovação genética das mutações que determinam a resistência às equinocandina (ARENDRUP et al., 2014).

O mecanismo da resistência às equinocandinas é complexo e envolve redução da atividade da enzima glucana sintetase, e conseqüentemente, má formação da parede celular por deficiência de glucana. A mutação, todavia, ocorre numa região do genoma chamada “hot spot” e envolve alterações nos genes FKS, determinando formação da enzima com substituição de aminoácidos, e, por isto, com redução de atividade em seu centro catalítico (ARENDRUP et al., 2014).

A resistência de *Candida* spp. as equinocandinas traz também alterações na virulência como redução da capacidade enzimática, redução do teor de glucana e aumento do de quitina, aumento da espessura da parede celular, redução da capacidade de

filamentação em *C. albicans*, redução no tamanho das cepas (20% menores) (BEN-AMI, 2012).

1.1.4 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 re-estabelecer o equilíbrio da cavidade bucal (CAVALCANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2011). Correspondem ao meio mais simples para veiculação de substâncias antissépticas, estes veículos são empregados como facilitadores da disseminação de compostos medicamentosos ativos destinados ao tratamento de afecções específicas, como a cárie e a doença periodontal, além de serem coadjuvantes dos procedimentos mecânicos de escovação (BAUROTH et al., 2003; BUGNO et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2008).

A maioria dos agentes antimicrobianos veiculados no mercado promovem o rompimento da parede celular, vindo a inibir, dessa forma, nos complexos enzimáticos bacterianos, o que culmina no comprometimento das atividades metabólicas bacterianas (SEGURA, 1999; BUGNO et al., 2006). Alguns princípios ativos possuem ação bactericida e bacteriostática, de maior ou menor intensidade, e é de extrema relevância que os profissionais de odontologia chamem a atenção dos seus pacientes e informem sobre a realização da higiene bucal adequada, uma vez que os enxaguatórios são coadjuvantes profiláticos (MARINHO; ARAÚJO, 2007).

Mais especificamente no caso de 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 bacterianos e fúngicos (SCHEP et al., 1995; GIULIANA et al., 1999; CASTRO, 2010; MAEKAWA et al., 2010).

Um agente antimicrobiano ideal deve possuir potencial contra os biofilmes dentais, tendo que, obrigatoriamente, causar redução da adesividade bacteriana às superfícies dentais e mucosas orais. Deve ser ativo para promover a inibição do crescimento, a proliferação dos microrganismos, bem como a inibição da formação da matriz intercelular dos biofilmes. Por

fim, deve modificar a ecologia do biofilme com vistas ao desenvolvimento de uma microbiota oral menos patogênica (MOREIRA et al., 2009).

Diante disso, diversos agentes antimicrobianos têm sido avaliados quanto às suas propriedades antifúngicas, estando entre eles, agentes obtidos de forma natural ou sintética como o cloreto de cetilperidínio, gluconato de clorexidina, nistatina e o triclosan.

1.1.4.1 Antissépticos bucais

1.1.4.1.1 Cloreto de cetilperidínio

O cloreto de cetilperidínio é um composto monovalente, catiônico, tensoativo pertencente ao grupo dos derivados da amônia quaternária o qual apresenta amplo espectro antimicrobiano, principalmente sobre patógenos gram-positivos e fungos leveduriformes (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 1940 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 1960 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 mostraram que o mecanismo de ação do cloreto de cetilperidínio está relacionado ao aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana (MOREIRA et al., 2009; THOMAS, 2011). Adicionalmente, Cannon & Chaffin (1999), afirmam que o cloreto de cetilperidínio 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 cetilperidínio alteraria a tensão superficial e ocasionaria a ruptura da parede celular fúngicas, estando a sua ação na dependência da concentração utilizada; essas propriedades atribuídas a este agente, tem uma boa eficácia na concentração de 0,05%, por sinal, encontrada na maioria dos produtos comerciais (YÉVENES, 2009).

Alves et al., (2012) afirmam que apesar da evidência científica ser escassa, a utilização de enxaguatórios contendo cloreto de cetilperidínio como complemento às formas mecânicas

de higiene oral parece fornecer um pequeno, mas significativo, benefício na redução da placa bacteriana e da inflamação gengival, se comparado com a escovação ou escovação seguida de bochechos com placebo.

O cloreto de cetilperidínio é uma amônia quaternária, composta por um anel alifático. Devido a sua ligação às glicoproteínas da cavidade oral, ele demonstra uma atividade prolongada, cobrindo o dente e a mucosa oral e sua atividade antimicrobiana é de largo espectro, causando a interrupção do metabolismo, crescimento celular e morte celular (ROCHA et al., 2008).

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

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

1.1.4.1.2 Gluconato de clorexidina

Desenvolvido durante a década de 1940, pelas indústrias químicas da Inglaterra, como forma de tratamento da malária, o gluconato de clorexidina foi introduzido no mercado em 1954 visando à antisepsia 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 bis-biguanidas e encontra-se disponível na forma de sais de gluconato e digluconato. Em síntese, o gluconato de clorexidina exibe propriedades como eficácia sob as baixas concentrações, alta substantividade, fator esse, 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 aos 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).

Um das principais vantagens do uso desse fármaco, habitualmente na concentração de 0,12%, é o amplo espectro antimicrobiano que alcança, uma vez que age sobre os microorganismos gram-positivos e gram-negativos, além da substantividade prolongada e contínua, apesar da presença de sangue e dos demais fluidos corporais (SEMENOFF SEGUNDO et al., 2007).

Embora o modo de ação do gluconato de clorexidina nas células fúngicas ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que este agente 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 de *C. albicans* por um curto período de tempo, ou ainda, a concentrações sub-letais 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.

O mecanismo de ação é iniciado a partir da ligação entre este antisséptico e a parede celular bacteriana, em função da possibilidade de adsorção das cargas positivas desta molécula às cargas negativas das superfícies bacterianas. Este fenômeno torna-a mais permeável permitindo a penetração deste agente ao meio citoplasmático e, conseqüentemente, causando o rompimento da membrana celular com extravasamento das estruturas celulares do microrganismo (KOCÁK et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012).

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 supra gengivais limitam o uso prolongado deste agente antisséptico (TORRES et al., 2000; BASCONES & MORANTE, 2006; CAVALCANTI et al., 2009; ELLEPOLA, 2001; MAEKAWA et al., 2010).

Esta droga tem um potencial promissor, porém se desconhece seu correto papel na terapia periodontal. A clorexidina na forma de enxaguatório continua sendo o melhor antimicrobiano tanto para redução de placa bacteriana quanto para gengivite, todavia, os efeitos colaterais limitam seu uso prolongado; Entretanto, Torres et al., (2000) esclarecem que o manchamento dentário ocorre na película adquirida, sendo passível de remoção profilática por se tratar de manchamento extrínseco.

1.1.4.1.3 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 dentifrícios, 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, dentifrícios e enxaguatórios bucais por deter atividades antimicrobianas, antiparasitárias e anti-inflamatórias (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 bis-fenol 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).

É mais frequentemente utilizado na composição dos enxaguatórios bucais na concentração de 0,03% (ZANIN et al., 2007). A ação deste composto baseia-se na desorganização da membrana plasmática através do aumento de sua permeabilidade e inibição da atividade das enzimas do tipo tripsina, modificando, assim, o transporte celular e impedindo o adequado metabolismo e reprodução das células bacterianas, evento que parece não implicar no desequilíbrio da microflora bucal (MOREIRA et al., 2009). Possui amplo espectro antimicrobiano, age contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas, demonstra efetividade contra o gênero *Mycobacterium*, as bactérias anaeróbias, assim como os esporos e fungos do gênero *Candida* (MARINHO; ARAÚJO, 2007; BUGNO et al., 2006; TORRES et al., 2000; MOREIRA et al., 2009).

Este antisséptico, por apresentar rápida liberação dos sítios de ligação, evidencia como característica sua baixa substantividade, ou seja, seu curto tempo de permanência na cavidade bucal. Por isto tem sido associado a outros produtos, entre eles o co-polímero gantrez (metoxietileno mais ácido maleico), a fim de aumentar o seu tempo de permanência na cavidade bucal (FERREIRA et al., 2014, 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 fungos leveduriformes. Sua associação ao copolímero Gantrez, aumenta sua

permanência na cavidade bucal. Outras associações também têm sido realizadas com o citrato de zinco que é efetivo contra a formação de placas e com o pirofosfato de sódio que tem efeito antitártaro. O triclosan pode se apresentar como constituinte de dentifrícios nas concentrações de 0,2 a 0,5% e como solução para bochecho na concentração de 0,03%. Sahtler & Fischer (1996) realizaram um estudo que observou que o uso de dentifrícios contendo triclosan gera maior redução de placas quando comparados com aqueles sem triclosan.

Diversos estudos demonstraram a potente ação antifúngica do triclosan (AROONRERK & DHANESUAN, 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 células de *Candida* na saliva de pacientes infectados pelo vírus HIV. 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.

Ressaltamos que não há ainda um consenso na literatura no que concerne ao efeito do triclosan em pacientes que fazem 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.

1.1.4.1.4 Nistatina

A nistatina foi descoberta no New York State Health Laboratory e designada de acordo com esse fato. A nistatina, sendo um poliênico, assemelha-se estruturalmente à anfotericina B e apresenta o mesmo mecanismo de ação antifúngica, porém a nistatina não é absorvida pelo trato gastrointestinal, pele ou vagina (GOODMAN & GILMAN, 2003). Extraída de culturas de *Streptomyces noursei*, a nistatina foi descoberta em 1950 (HACWYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006; AGUIAR, 2007), sendo considerado o primeiro tratamento eficaz de candidose bucal (NEVILLE, 2004). Desde então, tem sido empregada como antifúngico cuja indicação terapêutica atualmente está associada a combater o aumento de casos de candidíases em pacientes com câncer, AIDS e outras desordens sistêmicas (AGUIAR, 2007).

É o antifúngico poliênico tópico ou oral mais utilizado. O seu uso mais importante é no tratamento nas infecções tópicas ou superficiais por aplicação direta. A ação local de nistatina no controle da candidíase vulvovaginal ou infecções envolvendo o trato digestivo, desde a boca até o ânus, é atualmente tão popularizado que dispensa uma discussão mais aprofundada (MEDOFF & KOBAYASHI, 1980).

Este antisséptico é muito usado em tratamentos de candidíases oral e vaginal, não podendo ser utilizado em infecções sistêmicas. Seu espectro de ação inclui a maioria das espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. glabrata*. A nistatina se liga aos esteróis da membrana celular de leveduras, aumentando a permeabilidade da membrana e conseqüentemente causando seu rompimento. Convém ressaltar que a nistatina liga-se apenas a leveduras e não a bactérias, protozoários ou vírus (HALL, 2012). Seu mecanismo de ação mais aceito, atualmente, indica que a nistatina interage com o ergosterol, um esterol presente na membrana plasmática das células fúngicas. Tal ligação resulta em uma desorganização funcional da membrana plasmática, devido à formação de canais trans-membranares, acarretando a perda de água e íons essenciais para a sobrevivência celular, como potássio, amônio, magnésio, fosfato, além da perda de açúcares, ésteres de fosfato, nucleotídeos e proteínas. Essas alterações diminuem a permeabilidade seletiva das células fúngicas, culminando em danos celulares, e, posteriormente, na morte celular (HAC-WYDRO e DYNAROWICZLATKA, 2006; AGUIAR, 2007).

Vários estudos têm comprovado que a candidíase orofaríngea é a infecção mais comum entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo muitas vezes detectada em episódios recorrentes. O tratamento e o controle da recorrência dos episódios, em lesões pouco extensas, podem ser exclusivamente tópicos empregando-se a nistatina na forma de suspensão oral ou outras opções (WINGETER et al., 2007).

Os pacientes que fazem tratamento do câncer a base de radioterapia, manifestam uma tendência ao desenvolvimento de mucosite oral por radiação durante e até alguns dias após o tratamento. Na prevenção e ou tratamento dessa enfermidade oral, é recomendado realizar bochechos com nistatina como profilaxia antifúngica (ALBUQUERQUE & CAMARGO, 2006).

A toxicidade da nistatina manifesta-se bem elevada quando administrada por via intravenosa e intramuscular. Isto se deve a capacidade da nistatina em se ligar ao colesterol, outro tipo de esterol, presente na membrana plasmática das células de mamíferos. Devido à presença de esteróis em ambas as células, colesterol no mamífero e ergosterol no fungo, a

administração do fármaco leva à formação de poros tanto na célula patogena quanto na do hospedeiro. Essa ausência de seletividade provoca efeitos adversos e tóxicos nas células, sendo ainda capaz de causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais quando administrado por injeção. A atividade hemolítica é decorrente de sua ligação imediata com a membrana das hemácias, causando sua ruptura. Entretanto, devido à baixa absorção da nistatina pela pele, mucosas ou trato gastrointestinal, e ao fato de que após a administração oral, grande parte é encontrada inalterada nas fezes, ela é indicada na terapia via oral e tópica (HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006; AGUIAR, 2007).

Devido às suas características farmacológicas, é empregada para uso tópico, mesmo quando, concomitantemente, utilizada por via oral, obtendo-se um efeito superficial na mucosa oral e digestiva. Todavia, pode ocasionar efeitos adversos como náuseas, vômitos e diarreias, sendo as reações alérgicas mais raras. Muitas vezes, as náuseas são relacionadas ao sabor extremamente desagradável da nistatina, o que pode limitar o uso pelo paciente, diminuindo a adesão ao tratamento (AGUIAR, 2007). Diversas formas de apresentações farmacêuticas de nistatina são encontradas no mercado, destinadas à administração cutânea, vaginal ou oral. Para o tratamento da candidíase oral, orofaríngea e esofagiana, a nistatina apresenta-se na forma de suspensão oral, e deve ser administrado com inicial bochecho e posterior ingestão, o que é dificultado pelo seu sabor amargo (AGUIAR, 2007). Além da suspensão oral, a nistatina ainda é apresentada nas formas farmacêuticas de pastilhas medicamentosas e comprimidos bucais, ambos devendo ser dissolvidos lentamente na cavidade bucal (NEVILLE, 2004; AGUIAR, 2007).

1.2. PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

1.2.1. PROPOSIÇÃO

No contexto das doenças fúngicas oportunistas que acompanham os pacientes imunocomprometidos, as candidíases ocupam os primeiros lugares. A antifungoterapia a estas micoses tem registrado crescentes dificuldades ou mesmo falhas terapêuticas frente a situações como a emergência de espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos, notadamente ao fluconazol. A espécie *C. glabrata* tem a característica de, rapidamente, desenvolver resistência a este triazólico. Tradicionalmente, os antissépticos bucais são úteis enquanto adjuvantes da terapêutica das candidíases orais, porque reduzem a microbiota

fúngica e atuam sobre biofilmes incipientes. Todavia, não há estudos demonstrando a atividade antifúngica dos antissépticos bucais como o cloreto de cetilpiridínio, triclosan, clorexidina bem como do antifúngico poliênico nistatina sobre *C. glabrata* resistente ao fluconazol. O presente estudo objetiva-se a investigar estas questões.

1.2.2. OBJETIVOS

1.2.2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antifúngica dos enxaguatórios bucais cloreto de cetilperidínio, gluconato de clorexidina, triclosan e o antifúngico poliênico nistatina, *in vitro*, frente a isolados de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

1.2.2.2 Objetivos Específicos

Promover a resistência de *C. glabrata* ao fluconazol através da continuada exposição *in vitro* a este azólicos.

Comparar a suscetibilidade de *C. glabrata* fluconazol – sensível versus *C. glabrata* fluconazol – resistente frente ao cetilperidínio, clorexidina, triclosan e nistatina, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CF).

Avaliar a suscetibilidade de *C. glabrata* – sensíveis e resistentes ao fluconazol - frente ao cloreto de cetilperidínio, gluconato de clorexidina, nistatina e o triclosan através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Micro-organismos

Foram utilizados cepas de *C. glabrata* (n=30). Dois grupos foram formados, um grupo FS (fluconazol-sensível) e um grupo FR (fluconazol-resistente), derivado do primeiro,

contendo trinta isolados resistentes ao fluconazol. Os dois grupos pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI).

O grupo FR foi derivado do grupo FS após exposição a concentrações crescentes de fluconazol, conforme a técnica de indução da resistência proposta por Fekéte- Forgács et al, (2000).

1.3.2 Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos que foram testados foi Cloreto de cetilperidínio (Cetylpyridinium chloride), Gluconato de clorexidina (Chlorhexidine digluconate solution), Nistatina (Nystatin) e o Triclosan. Esses compostos foram adquiridos na Sigma-Aldrich Brazil, no laboratório foram solubilizados em água e armazenados em freezer a -80°C.

1.3.3 Indução da resistência ao fluconazol *in vitro*

Seguindo a técnica proposta por Fekéte- Forgács et al. (2000) as culturas de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol serão semeadas em tubos contendo Caldo Sabouraud e incubadas a 30°C. As densidades dos inóculos serão, a seguir, padronizadas em novos cultivos com Caldo Sabouraud com base na turvação medida em espectrofotômetro para absorvância 0,1 a 640 nm. Os cultivos padronizados serão incubados a 30°C e, após 10 horas, será acrescentado fluconazol resultando em uma concentração final de 8µg/mL. Decorridas 14 horas de incubação, as células das culturas contendo fluconazol serão novamente transferidas para tubos com Caldo Sabouraud e fluconazol 8µg/mL e, incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas. Este procedimento será realizado por três vezes consecutivas.

Após a terceira incubação, as células serão transferidas para novos tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol na concentração final de 8µg/mL a fim de que se obtenha em espectrofotômetro uma absorvância final de 0,1 a 649 nm. Depois de 10 horas de incubação será adicionado fluconazol suficiente para obtenção de 16µg/mL de fluconazol. Os cultivos serão incubados a 30°C por 24 horas sob agitação. Os ensaios serão repetidos duplicando-se a concentração de fluconazol até que se atinja 64µg/mL. As células do cultivo final serão semeadas e mantidas em ASD.

1.3.4. Testes de suscetibilidade

A suscetibilidade das cepas de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol foi determinada pelo método de microdiluição em Caldo RPMI 1640, de acordo com o protocolo aprovado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* [M27-A3] (CLSI, 2008) com a interpretação dos breakpoints de acordo com o documento M27-S4 de 2012. As faixas de concentração a serem testadas para cada fármaco estão descritas no Quadro 1.

Fármacos	Faixa de concentração (µg/mL)	
Cloreto de cetilperidínio	0,008 – 4,00 µg/mL	(Edlind, et al.; 2005)
Gluconato de clorhexidina	0,125 – 64,00 µg/mL	(SALIM et al.,2013)
Nistatina	0,125 – 64,00 µg/mL	(CHOUKRI et al., 2013)
Triclosan	0,125 – 64,00µg/mL	(YU et al., 2011)

Quadro 1 – Faixa de concentração testada para cada fármaco.

1.3.4.1 Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo foram realizados sub-cultivos do isolados de *C. glabrata* em tubos estéreis de ASD, incubados em estufa a 35°C por 48 horas.

A seguir as colônias foram suspensas em solução salina 0,85% estéril. A suspensão resultante foi colocada em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular ajustada em espectrofotômetro a fim de se obter uma transmitância (88 a 92%) equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células por mL), em comprimento de onda de 530 nm. A seguir foi feita uma diluição 1:50 em água estéril, seguida de uma diluição 1:20 em meio RPMI 1640, resultando em uma concentração de $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$ células por mL.

1.3.4.2. Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)

Para o ensaio da determinação das CIMs dos fármacos isolados se utilizou microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo chato. Primariamente se adicionou 100 μ L do fármaco nas diferentes concentrações, distribuídos de forma seriada nos poços de 1 a 10 das microplacas. As fileiras 11 e 12 foram os controles negativo e positivo, respectivamente. Posteriormente se adicionou 100 μ L do inóculo previamente ajustado e diluído em Caldo RPMI 1640. Visto que há uma diluição 1:2 do fármaco quando combinada com o inóculo, as concentrações iniciais dos fármacos foram duas vezes mais concentradas do que as concentrações finais desejadas.

As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. Após realizou-se a leitura, considerando 100% de inibição em relação ao controle positivo.

1.3.4.3. Determinação das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs)

Para determinação das CFMs, após a leitura das placas, retiraram-se alíquotas de 10 μ L dos poços onde observou-se a inibição total do crescimento (CIM) e de mais dois com as concentrações acima da CIM. Esta alíquota foi colocada em tubos de hemólise contendo caldo Sabouraud Dextrose e foi incubada por 48h a 35°C. Após, fez-se a leitura observando se houve turvação ou não do meio, considerando a concentração fungicida mínima a menor concentração onde não foi observado crescimento.

2. ARTIGOS

2.1 Artigo n° 1

Suscetibilidade *in vitro* de *Candida glabrata* fluconazol-resistente frente à nistatina e a antissépticos de uso bucal.

Octavio Couto Moreira¹, Laura Bedin Denardi¹, Sydney Hartz Alves^{1*}

Universidade Federal de Santa Maria; Santa Maria, RS, Brasil.

Resumo

Este estudo buscou avaliar a suscetibilidade de 30 isolados de *Candida glabrata* sensíveis ao fluconazol (FS) e 30 isolados, derivados dos primeiros, mas considerados resistentes a este triazólico (FR), frente aos antissépticos cloreto de cetilpiridínio (CPC), triclosan (TRC), gluconato de clorhexidina (CHX) e ao antifúngico nistatina. Os ensaios de suscetibilidade foram realizados com base documento M27-A3 (2008) onde determinou-se as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações fungicidas mínimas (CFMs). As CIMs e CFMs não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos fluconazol-sensível (FS) e fluconazol-resistente (FR) ($p > 0,05$), exceto frente às CFMs de CHX. As médias geométricas das CIMs e CFMs permitiram classificar os antimicrobianos que em ordem decrescente de atividade foram: cloreto de cetilpiridínio > nistatina > clorhexidina > triclosan. A atividade fungicida da CHX foi significativamente maior frente ao grupo FR do que no grupo FS ($p < 0,05$). Os autores discutem a importância do monitoramento da suscetibilidade aos agentes antifúngicos e antissépticos de uso nos enxaguatórios bucais como forma de detectar alterações na atividade antifúngica bem como a emergência de *C. glabrata* resistentes aos antissépticos.

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

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor-correspondente

Rua dos Andradas 1985/201. Santa Maria, RS, Brasil.

CEP: 97010-033

Introdução

Conhecida desde a Grécia antiga, a candidíase oral continua a causar transtornos na saúde do homem e tem destacada presença junto ao desenvolvimento da medicina moderna. Entre os recém-nascidos sua frequência é de 5-7% mas na AIDS tem sido estimado que mais de 90% dos pacientes desenvolvam esta infecção em algum momento durante o progresso da doença (Berberi et al., 2015). *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada, todavia, outras espécies do gênero *Candida* como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e outras sejam também implicadas na candidíase oral (Garcia-Cuesta, et al., 2014). Nas candidíases orais dos recém-nascidos, *C. albicans* é a espécie predominante, entretanto, entre pacientes com câncer sob tratamento radioterápico ou antineoplásico e com uso concomitante de fluconazol, *C. glabrata* é a espécie dominante (Nucci et al., 2005). O renovado interesse pelo estudo das candidíases orais advém das elevadas taxas da doença entre pacientes imunocomprometidos bem como pelas dificuldades terapêuticas que apresentam, sobretudo em relação à emergência de isolados resistentes aos antifúngicos. A resistência de *Candida* spp aos antifúngicos é um fenômeno que acompanhou o desenvolvimento da antifungicoterapia à base de azólicos, particularmente, frente ao fluconazol. Entre as espécies de *Candida*, *C. glabrata* desponta como a mais envolvida nos casos de resistência. Os novos *breakpoints* espécie-específicos, definidores da resistência aos antifúngicos foram recentemente estabelecidos pelo documento M27-S4 do CLSI (2012) e, com base nestes novos critérios, os percentuais de *C. glabrata* não-sensíveis ao fluconazol alteraram-se de menos de 10% para 62% (Farmakiotis et al., 2014). Em Odontologia, bem como entre pacientes sob tratamentos contra o câncer, o uso de antissépticos sob forma de enxaguatórios bucais como adjuvante à terapêutica antimicrobiana, é uma prática bem estabelecida (Arooker et al. 2007; Ellepola et al., 2001). Tais enxaguatórios são formulados com antissépticos como cloreto de cetilpiridínio, triclosan e clorhexidina. A atividade antibacteriana destes compostos é bem conhecida, mas a suscetibilidade da microbiota fúngica, notadamente espécies de *Candida* resistentes a antifúngicos, não tem sido avaliada. A nistatina é um antifúngico poliênico de primeira escolha no tratamento das candidíases orais, pois não é absorvida pelo trato gastrointestinal; entretanto, o mau gosto e a necessidade de tratamentos prolongados são fatores que podem comprometer tais tratamentos (Garcia-Cuesta et al., 2014). O presente estudo foi objetivado a avaliar se a resistência de *C. glabrata* aos azólicos tem impacto na suscetibilidade aos antissépticos de uso bucal e a nistatina.

Material e Métodos

Micro-organismos: foram estudados dois grupos de *C. glabrata*. O primeiro foi constituído de 30 isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol (FS) e o segundo, formado pelos mesmos 30 isolados tornados resistentes ao fluconazol após prolongada exposição a este triazólico, conforme método de Fekéte-Forgács (2000). Os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes de acordo com os critérios interpretativos do documento M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Todos os isolados foram identificados através do kit comercial ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). *C. glabrata* ATCC 2001 foi utilizada como controle.

Agentes antimicrobianos: os compostos avaliados incluíram o cloreto de cetilpiridínio (Sigma), triclosan (Sigma), gluconato de clorhexidina (Sigma) e nistatina (Sigma).

Testes de suscetibilidade: foram realizados de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). Os agentes antimicrobianos foram solubilizados em DMSO, de forma a se obter soluções-estoque, respectivamente de: gluconato de clorhexidina (12,8 mg/mL), cloreto de cetilpiridínio (12,8 mg/mL), triclosan (12,8 mg/mL) e nistatina (12,8 mg/mL). Volumes de 100 µL destes compostos diluídos eram dispensados em placas de microtitulação estéreis contendo 96 poços. As concentrações finais nas placas, após acréscimo de 100 µL do inóculo padronizado resultaram em intervalos de: clorhexidina (0,125- 64 µg/mL), cloreto de cetilpiridínio (0,008-4,0 µg/mL), triclosan (0,125 – 64 µg/mL) e nistatina (0,125 – 64 µg/mL). O meio de cultura consistiu de caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS e acrescido de dextrose até concentração final de 2%. Os inóculos foram padronizados suspendendo-se 5 colônias das leveduras (após crescimento de 48 hs no ágar Sabouraud dextrose) em solução salina estéril e ajustando-se a turbidez de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). Os testes foram realizados em triplicata. Cada série incluiu um controle de crescimento, um controle de crescimento positivo e um controle negativo (caldo RPMI 1640 sem inóculo). As suspensões celulares foram diluídas 1:50 em água destilada estéril e a 1:20 em caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS e acrescido de dextrose 2%. Volumes de 100 µL da suspensão celular fúngica padronizada eram adicionados a cada poço contendo o antimicrobiano em estudo. A seguir, as placas eram incubadas a 35°C durante 24 hs. O crescimento fúngico era monitorado visualmente. As CIMs de cada agente antimicrobiano foram definidas como a menor concentração requerida para inibir 100% do crescimento fúngico após a incubação.

Determinação das concentrações fungicidas mínimas (CFM) (Cantón et al., 2003): as CFMs foram determinadas após o subcultivo de 10 µL de cada poço onde ocorreu a inibição do crescimento (poços límpidos) utilizando-se o agar Sabouraud dextrose, distribuído em placas de Petri, com o meio de subcultivo. A menor concentração dos agentes antimicrobianos que resultou em subcultivo negativo foi considerada como a concentração fungicida mínima.

Análise estatística: os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). ANOVA de uma via foi empregada para comparar a atividade dos compostos antissépticos bem como da nistatina (CIMs e CFMs) em cada um dos grupos (FS) e (FR). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Frente à nistatina ambos os grupos FS e FR evidenciaram os mesmos valores de CIM50 e CIM90. A comparação das CIMs e CFMs não evidenciou diferenças significativas entre os dois grupos ($P > 0,05$).

Embora evidenciando o mesmo intervalo de CIMs que o observado para a nistatina, os testes com triclosan revelaram CIM50 = 16 µg/mL e CIM90 = 32 µg/mL para ambos os grupos; as diferenças observadas entre os grupos FS e FR não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

A suscetibilidade dos grupos FS e FR frente ao cloreto de cetilpiridínio variou entre 0,008 e 4,0 µg/mL e diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Os testes com gluconato de clorhexidina revelaram CIMs distribuídas num intervalo similar a nistatina e ao triclosan; todavia, não foram detectadas diferenças significativas entre as CIMs dos grupos FS e FR ($P > 0,05$).

Em relação à comparação das atividades entre os antimicrobianos, detectou-se que a nistatina, cloreto de cetilpiridínio e clorhexidina foram similares ($P > 0,05$) enquanto que o triclosan revelou atividade antifúngica significativamente menor que os demais compostos ($P < 0,05$).

Quando se avaliou a atividade fungicida, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos FS e FR frente à nistatina, cloreto de cetilpiridínio e triclosan ($P > 0,05$). Já para o gluconato de clorhexidina, as CFMs diferiram significativamente entre os grupos FS e FR ($P < 0,05$).

Em relação à comparação das atividades entre os antimicrobianos, detectou-se que a nistatina e o cloreto de cetilpiridínio evidenciaram atividade similar ($P > 0,05$). Por outro lado, o gluconato de clorhexidina e o triclosan evidenciaram diferenças estatisticamente diferentes entre as CFMs ($P < 0,05$).

Discussão

O fenômeno da resistência aos antifúngicos só pode ser melhor estudado após a padronização das técnicas para avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos. Para avaliação de *Candida* spp, a primeira avaliação ocorreu em 1997 com a publicação do documento M27-A do CLSI. O documento M27-A2 (2002) e o M27-A3 (2008) indicam a necessidade de permanentes ajustes para melhor se avaliar o crescente fenômeno da resistência nas espécies do gênero *Candida*.

O fluconazol é um antifúngico triazólico de largo emprego nas candidíases orais; entretanto, prolongados tratamentos concorrem para a emergência de isolados resistentes ou simplesmente a substituição de espécies predominantemente sensíveis como *C. albicans* por espécies menos sensíveis como *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, participantes da microbiota oral (Kurnatowski et al., 2014).

Estudos de suscetibilidade reportaram que 61,9% dos isolados de *C. glabrata* são originalmente sensíveis ao fluconazol; todavia, os tratamentos revertem rapidamente o perfil de sensível para resistente e esta resistência costuma ser cruzada a todos os demais azólicos (Pfaller et al., 2004). No presente estudo, a exposição *in vitro* ao fluconazol gerou isolados considerados resistentes com base nos *breakpoints* definidos no documento M27-A3 (CLSI, 2008).

A reduzida sensibilidade de *C. glabrata* também se manifesta, em menores proporções, frente a outros antifúngicos como a anfotericina B e a 5-fluorocitosina (Diekema et al., 2002). Recentemente, a emergência de resistência às equinocandinas é alarmante, pois, atingiu 10,3 % de *C. glabrata* isolada de casos de candidemia e a multirresistência (azólicos + equinocandinas) atingiu o percentual de 6,8 % (Farmakiotis et al., 2014).

Os antissépticos como cloreto de cetilpiridínio, triclosan e gluconato de clorhexidina são comumente utilizados em cremes dentais, sabões para mãos e nos enxaguatórios de uso bucal tanto na profilaxia como auxiliar na terapêutica antifúngica das candidíases orais (McDonnell, 1999).

O cloreto de cetilpiridínio é um antisséptico catiônico derivado do amônio quaternário. É largamente empregado em enxaguatórios bucais para prevenção e tratamento da candidíase

e outras infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação fundamenta-se na sua capacidade de alterar e modificar a tensão superficial da parede celular microbiana, fato que conduz à morte bacteriana (MacDonnell, 1999). No presente estudo a atividade fungistática e fungicida do cloreto de cetilpiridínio variou entre 0,008 e 4 µg/mL, portanto, superior aos reportados por Fathila et al. (2012) para *C. tropicalis* (66 µg/mL) e *C. krusei* (33 µg/mL). Edling et al. (2005) reportaram o achado de dois isolados de *C. albicans* com reduzida sensibilidade ao cloreto de cetilpiridínio, sugerindo que a exposição frequente a este antisséptico pode selecionar isolados resistentes. Nossos resultados não confirmaram achados similares nos grupos de *C. glabrata* estudados.

O triclosan é um derivado bifenólico tradicionalmente incluído em produtos de higiene. Jones et al. (2000) revisaram a atividade do triclosan sobre fungos registrando CIMs variáveis entre 1,63 µg/mL para o *Epidermophyton floccosum* a 5000 µg/mL para o *Blastomyces dermatitidis*; *C. tropicalis* foi inibida pela concentração de 2500 µg/mL. Nossos resultados evidenciaram que a concentração de 32 µg/mL foi capaz de inibir 90% de *C. glabrata* sensíveis ou resistentes ao fluconazol, um dado que aponta para a segurança do uso deste antisséptico. Por outro lado, cabe ressaltar que a combinação triclosan + fluconazol evidenciou sinergismo frente a *C. albicans* fluconazol-resistente (Yu et al., 2011).

O gluconato de clorhexidina é, quimicamente, um derivado da biguanidina e, provavelmente, o biocida mais amplamente empregado em formulações de antissépticos comercialmente disponíveis (McDonnell 1999). Nossos resultados evidenciaram que como agente fungistático é igualmente ativo sobre *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol; todavia, o grupo fluconazol-resistente foi significativamente mais sensível à atividade fungicida da clorhexidina do que o grupo fluconazol-sensível. Estes achados revelam-se contrários ao inicialmente esperado, ou seja, de que o grupo FR também manifestasse redução da sensibilidade aos antissépticos. A explicação para tal achado não foi ainda reportada na literatura consultada, mas é possível hipotetizar que alterações na parede celular e nas nucleoproteínas dos isolados do grupo FR favoreçam a atividade fungistática da clorhexidina. Por outro lado, cabe também considerar que as CIMs aqui relatadas foram inferiores às relatadas por Fathilah et al. (2012) para *C. tropicalis* (75 µg/mL) e *C. krusei* (150 µg/mL), o que reforça os achados de que há variações na suscetibilidade à clorhexidina de acordo com a espécie de *Candida*. Outra constatação importante é o relato de aumento das CIMs de clorhexidina após continuada exposição de *C. albicans* a este agente (Thurmond et al., 1991) revelando que a resistência de *Candida* spp à clorhexidina é um problema que requer futuras avaliações.

Disponível há mais de cinquenta anos, a resistência a nistatina não tem sido comprovada de forma categórica. Junto com a anfotericina B e a natamicina são os únicos antifúngicos poliênicos disponíveis para uso humano (Ellepolla, 2000). Devido à ausência de *breakpoints* para estes poliênicos, a classificação de isolados resistentes a estes antifúngicos tem sido mais raramente reportada. No presente estudo, a resistência de *C. glabrata* ao fluconazol não afetou a suscetibilidade à nistatina cujas CIMs e CFMs não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos FS e FR.

Finalmente, nossos resultados permitiram concluir que a resistência de *C. glabrata* ao fluconazol não manifestou impactos negativos na atividade dos antissépticos estudados e da nistatina. Se, por um lado, nossos resultados apontam para a segurança na prescrição destes antissépticos como coadjuvantes do tratamento das candidíases orais, por outro, é pertinente lembrar que no presente estudo não se avaliou o desenvolvimento da resistência após exposição aos mesmos. Segundo Fraise et al. (2002) as alterações na parede celular dos micro-organismos promovidas pelos antissépticos pode alterar a permeabilidade celular, com repercussões na atividade dos antimicrobianos. Estas constatações requerem que novos estudos avaliem o desenvolvimento da resistência de *Candida* spp após exposição *in vitro* aos antissépticos e defina seu real impacto na terapêutica antifúngica.

Tabela 1 – Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente à nistatina e compostos antissépticos triclosan, cloreto de cetilpiridínio e clorhexidina.

Compostos	Grupos	Intervalos das CIMs	CIM50	CIM90	MG
Nistatina	FS	0,125 – 64,000	2,000	2,000	1,803
	FR	0,125 – 64,000	2,000	2,000	1,932
Triclosan	FS	0,125 – 64,000	16,000	32,000	13,929
	FR	0,125 – 64,000	16,000	32,000	14,420
Cloreto de Cetilpiridínio	FS	0,008 – 4,000	1,000	4,000	1,109
	FR	0,008 – 4,000	1,000	2,000	1,109
Clorhexidina	FS	0,125 – 64,000	4,000	8,000	4,757
	FR	0,125 – 64,000	4,000	8,000	4,595

CIM 50 = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados do grupo testado;

CIM 90 = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados do grupo testado;

MG= Média geométrica;

FS= *C. glabrata* sensível ao fluconazol; FR= *C. glabrata* resistente ao fluconazol.

Tabela 2 – Atividade fungicida ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente à nistatina e compostos antissépticos triclosan, cloreto de cetilpiridínio e clorhexidina.

Compostos	Grupos	Intervalos das CFMs	CFM50	CFM90	MG
Nistatina	FS	0,125 – 64,000	2,000	2,000	1,803
	FR	0,125 – 64,000	2,000	2,000	2,000
Triclosan	FS	0,125 – 64,000	16,000	32,000	16,000
	FR	0,125 – 64,000	16,000	32,000	14,928
Cloreto de Cetilpiridínio	FS	0,008 – 4,000	2,000	4,000	1,682
	FR	0,008 – 4,000	1,000	2,000	1,319
Clorhexidina	FS	0,125 – 64,000	4,000	16,000	6,498
	FR	0,125 – 64,000	4,000	8,000	5,098

CFM 50 = Concentração fungicida mínima capaz de matar 50% dos isolados do grupo testado;

CIM 90 = Concentração fungicida mínima capaz de matar 90% dos isolados do grupo testado;

MG= Média geométrica;

FS= *C. glabrata* sensível ao fluconazol; FR= *C. glabrata* resistente ao fluconazol

Referências

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

BERBERI A, NOUJEIM Z, AOUM G. Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients and CD4+ Counts. *Journal of International Oral Health*. 2015; 7: 20–23.

CANTÓN E, PEMÁN J, VIUDES A, QUINDÓS G, GOBERNADO M, ESPINEL-INGROFF A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; Mar;45(3):203-206.

Clinical Laboratory and Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard. M27-A3. CLSI, Wayne. 2008.

DIEKEMA D J; PFALLER M A; JONES N R. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Internat. Jour. of Antimicrob Ag.* 2002; 20: 412-418.

EDLING MP, SMITH WL, EDLING TD. Effects of cetylpyridinium chloride resistance and treatment on fluconazol activity versus *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 2005; 49: 843 – 845.

ELLEOPOLA A.N.B; SAMARANAYAKE L.P. Oral *Candida* infections and antimycotics. *Critical Review Oral Biology and Medicine*, 2000; v.11, 172-198.

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

FARMAKIOTIS D, TARRAND JJ, KONTOYIANNIS DP. Drug-Resistant *Candida glabrata* Infection in Cancer Patients. *Emerging Infectious Diseases* 2014; 20 (11): 1833-1840.

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*, 2012; v.40, p.609-615.

FEKÉTE-FORGÁCS K.; GYURC L.; LENKEY B. Chances of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*, 2000; 43: 273-279.

FRAISE AP. Biocide abuse and antimicrobial resistance--a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49:11-12.

GARCIA-CUESTA C, SARRION-PÉREZ MG, BAGÁN JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 2014; 6(5): e576–e582.

JONES RD, JAMPANI HB, NEWMAN JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infectious Control*. 2000; Apr; 28(2):184-196.

KURNATOWSKI P, MOQBIL S, KACZMARCZYK D. Signs, symptoms and the prevalence of fungi detected from the oral cavity and pharynx of radiotherapy subjects with head and neck tumors, and their susceptibility to chemotherapeutics. *Annals Parasitology* 2014; 60(3):207-213.

MCDONNELL G, RUSSELL AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; Jan;12(1):147-179.

NUCCI M, MARR KA. Emerging fungal diseases. *Clinical Infections Diseases* 2005; 41: 1058-1063.

PFALLER M. A.; MESSER S. A.; BOYKEN L.; HOLLIS R. J.; RICE C.; TENDOLKAR S.; DIEKEMA D. J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systematically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 3142-3146.

THURMOND JM, BROWN AT, SIMA 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 Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1991; 72(3): 291-295.

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011; July, 55(7): 3609-3612.

3. DISCUSSÃO

A candidíase de orofaringe, em suas múltiplas apresentações clínicas, historicamente, tem sido relacionada à *C. albicans*. Até meados do século XX esta situação foi mais ou mesmo estável. A partir daí, os avanços médicos permitiram a identificação de outras espécies, que, entretanto, continuavam como minoritárias. Por volta da década de 1980, os transplantes e novas possibilidades terapêuticas determinaram maior sobrevivência aos pacientes com câncer e, assim, as micoses oportunistas tiveram sua prevalência aumentada. Na mesma época, surge a pandemia causada pelo HIV, onde as candidíases, sobretudo as de orofaringe são notadamente frequentes (PFALLER, 2012).

As candidíases, em suas distintas formas clínicas, colocavam em risco a vida de pacientes das mais diferentes condições: de benignas e passageiras na orofaringe dos recém-nascidos a *causa mortis* de pacientes com candidemias. As terapêuticas antifúngicas requeriam novas abordagens. Assim, por volta de 1990 são lançados o fluconazol e o itraconazol, ambos antifúngicos azólicos com amplo espectro de ação sobre fungos leveduriformes e filamentosos, respectivamente (PFALLER, 2012).

Pouco tempo depois da introdução do fluconazol, dois fenômenos passaram a ser progressivamente observados: a emergência de isolados de *Candida* spp menos sensíveis o que requeria a utilização de doses mais elevadas de antifúngico, e a substituição de espécies mais prevalentes como *C. albicans* por outras até então minoritárias (PFALLER, 2012).

O fenômeno da resistência de *Candida* spp aos antifúngicos requeria comprovação. Neste contexto ganha impulso o desenvolvimento das técnicas padronizadas para a avaliação deste fenômeno. Assim, o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), na época chamado de *National Committee for Clinical and Laboratory Standard* (NCCLS) propõem técnicas padronizadas para utilização universal e aplicadas a laboratórios clínicos hospitalares. A sucessão de documentos M27-P (1992), M27-A (1998), M27-A2 (2002), M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012) evidenciam a trajetória de dificuldades nestas padronizações e interpretações, baseadas somente nas técnicas de microdiluição em caldo; outras técnicas como de difusão em ágar e para fungos filamentosos foram também desenvolvidas (PFALLER, 2012).

Enquanto as técnicas para detecção da resistência se desenvolviam, outro fenômeno, decorrente da terapêutica antifúngica com fluconazol, também definia novos desafios: o

tratamento antifúngico para espécies menos sensíveis. Espécies como *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* passaram a ser mais frequentes, todavia, seu impacto na resistência foi pequeno. Entretanto a substituição de *C. albicans* por *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* trouxe maiores dificuldades aos tratamentos, impactando nas taxas de morbimortalidades. *C. krusei* é uma espécie que faz parte da microbiota do trato gastrointestinal humano e que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol; entretanto, *C. glabrata*, que é primariamente sensível, apresenta potencial para rápido desenvolvimento da resistência ao fluconazol e tem se consolidado como a segunda espécie de *Candida* mais isolada das candidemias na América do Norte e Europa. *C. dubliniensis*, enquanto componente menor da microbiota oral também tem, em menor grau, a capacidade de desenvolvimento de resistência ao fluconazol (DORE & COOPER, 2006; PFALLER, 2012).

Mais recentemente, com a popularização no uso das equinocandinas – caspofungina, micafungina e anidulafungina – nos tratamentos das candidíases sistêmicas, outros dois fenômenos são registrados: a) a seleção natural de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, naturalmente menos sensíveis a estes fármacos; b) emergência de *C. glabrata* resistente a equinocandinas (RODRIGUES et al., 2014).

Neste novo contexto, *C. glabrata* desponta como a espécie de *Candida* com maior propensão ao desenvolvimento de resistência a agentes ao qual ela é frequentemente exposta. Tal evento é decorrente de sua biologia, onde enzimas localizadas na membrana plasmática funcionam como bombas de efluxo, devolvendo ao meio externo os azólicos que atravessam esta barreira; no caso das equinocandinas, eventos genéticos impedem a adequada interação das equinocandinas com a enzima glucana sintetase, impedindo sua atividade. Há também indícios de que o aumento da camada de quitina da parede celular concorra para a manifestação da resistência as equinocandinas. Estas constatações tornam *C. glabrata* alvo de preocupações, pois até onde este micro-organismo tem capacidade de desenvolver resistência? Que outros fármacos estarão implicados no desenvolvimento da resistência manifestada em *C. glabrata*? Estas indagações merecem urgentes investigações (PFALLER et al., 2012).

No presente estudo, investigou-se se os antissépticos bucais – cloreto de cetilpiridínio, triclosan, clorhexidina e o antifúngico poliênico nistatina - mantém suas atividades antifúngicas sobre *C. glabrata* resistentes ao fluconazol. Estes antissépticos são há muito utilizados como auxiliares na redução da microbiota bacteriana e fúngica da boca, colaborando no impedimento da formação de biofilmes, sobretudo em pacientes com estomatite protética. São também, largamente utilizados em pacientes hospitalizados com

risco de desenvolvimento de candidíase bem como nos casos de imunocomprometimento com risco a disseminação sistêmica de *Candida* spp (RAMAGE et al., 2012).

O desenvolvimento do presente estudo requereu a formação de um grupo de isolados de *C. glabrata* com comprovada resistência *in vitro* ao fluconazol. Para tanto, isolados originalmente sensíveis foram expostos a concentrações crescentes de fluconazol, o que, com sucesso, gerou o grupo aqui nomeado de fluconazol-resistente (FEKETE- FORGÁCS et al., 2000).

A atividade dos antissépticos de uso bucal e da nistatina foi avaliada com base no estudo da suscetibilidade, comparando-se os dois grupos de *C. glabrata*, nomeadamente, sensíveis e resistentes ao fluconazol. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e fungicidas mínimas (CFMs) foram tomadas como parâmetros para caracterizar quantitativamente as diferenças entre os grupos. A ausência de pontos de corte (*breakpoints*) definidores de sensibilidade ou resistência aos antissépticos e a nistatina requereu que as diferenças fossem comprovadas com base na comparação das CIMs e das CFMs entre os dois grupos.

Os resultados encontrados apontaram para a preservação da atividade fungistática dos antissépticos estudados bem como da nistatina frente ao grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol. Com relação à atividade fungicida, diferenças entre os grupos só foram constatadas em relação à clorhexidina que, surpreendentemente evidenciou maior atividade sobre o grupo fluconazol-resistente. Tal achado registra a segurança no uso destes antissépticos bem como da nistatina na prevenção ou tratamento das candidíases orais causadas por *C. glabrata*.

Numa perspectiva futura, visando comprovação de nossos achados, é pertinente a avaliação do papel dos biofilmes de *C. glabrata* e sua suscetibilidade aos antissépticos bucais e a nistatina; da mesma forma tais biofilmes formados por isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol. Considerando os crescentes relatos de *C. glabrata* resistentes a equinocandinas bem como de *C. glabrata* evidenciando resistência simultânea a azólicos e equinocandinas, é cabível a investigação da suscetibilidade destes novos grupos, tanto em suas formas plantônicas como de biofilmes frente aos antissépticos aqui estudados.

Por fim, cabe lembrar as constatações de aumento das CIMs de clorhexidina após continuada exposição de *C. albicans* a este agente (THURMOND et al., 1991); a frequente exposição de *C. glabrata* a crescentes concentrações de clorhexidina teriam sua suscetibilidade alterada? E a suscetibilidade de *C. glabrata* aos antifúngicos após exposição a outros antissépticos? Ainda é pertinente indagar qual a suscetibilidade de outras espécies de

Candida aos antifúngicos após exposição continuada aos antissépticos. Tais perguntas merecem urgentes respostas para embasar práticas terapêuticas há muito consolidadas, mas, que pelas alterações da biologia de *Candida*, diante a introdução de novos fármacos, podem requerer novas abordagens.

4. CONCLUSÃO

Todos os isolados de *C. glabrata* evidenciaram resistência (CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$) ao fluconazol após a exposição continuada, *in vitro*, a este antifúngico.

A suscetibilidade de *C. glabrata* aos antissépticos, cloreto de cetilperidínio, gluconato de clorhexidina, triclosan e a nistatina não evidenciou diferenças significativas entre os grupos sensível e resistente ao fluconazol, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e nas concentrações fungicidas mínimas (CFMs).

Com base nas concentrações fungicidas mínimas (CFMs) de gluconato de clorhexidina, o grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol foi mais sensível a este antisséptico do que o grupo sensível ao fluconazol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIRAMI, C. P.; VENUGOPAL, P. V. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of toothpastes. **J Mycol Med**, v.15, p. 247-249, 2005.

AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de novos comprimidos bucais de nistatina para tratamento de candidíase oral**. Rio de Janeiro, 2007, 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, I. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* das plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n.2, p. 222- 224, 2009

ALVES, D. COSTAB, A., ALMEIDA, R., CARVALHO, J., FELINO, A. Cloreto de cetilpiridínio – revisão da literatura. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac**, Porto, v. 53, n. 3, p.181–189, 2012.

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

ALBUQUERQUE, I. L. de S., CAMARGO, T. C.; Prevenção e tratamento da mucosite oral induzida por radioterapia: revisão de literatura. **Rev Bras Cancerol**, v.53, n. 2, p. 195-209, Out., 2006.

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.

ARAUJO, D. B. et al. Mouthrinses: active ingredients, pharmacological properties and indications. **Rev Gaúcha Odontol**, Porto Alegre, v.60, n.3, p.349-357, 2012.

ARENDRUP, Maiken Cavling; PERLIN, David S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? NIH Public Access. **Curr Opin Infect Dis**. 2014; 27(6): 484–492. 2014.

ARRAES, A. C. P. Detecção da diversidade molecular de *Candida spp.* isoladas de UTI neonatal. Salvador, 2012. 107 f. p. 22-30. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

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

BALKIS, M. M.; LEIDICH, S. D.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, 62: 1025-1040, 2002.

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

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. **J Clin Microbiol**; 34: 454-456, 1996.

BAUROTH, K. et al. The efficacy of an essential oil antiseptic mouthrinse vs. dental floss in controlling interproximal gingivitis: a comparative study. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 134, n. 3, p. 359-365, 2003.

BEN-AMI, Ronen; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.. Resistance to echinocandins comes at a cost: The impact of FKS1 hotspot mutations on *Candida albicans* fitness and virulence. **J Virulence**. 2012 Jan 1; 3(1): 95–97. Estados Unidos da América. 2012.

BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K.A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 1773-1777, 2004.

BHARGAVA, H. N; LEONARD, P.D. Triclosan: Applications and safety, **Am J Infect Control**, v. 24, n. 3, p. 209-218, 1996.

BIALKOVÁ, A.; SUBIK, J. Biology of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, 51: 3-20, 2006.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KONTOYANNIS, D. P.; RAAD, I. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, 112: 380-385, 2002.

BUDTZ-JØRGENSEN E, THEILADE E, THEILADE J, ZANDER HA. Method for studying the development, structure and microflora of denture plaque. **Scand J Dent Res.** 1981; 89(2): 149-56

BOUCHARA, R. A.; DECLERCK, P.; CIMON, B.; PLANCHENAUT, C.; DE GENTILE, L.; CHABASSE, D. Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin. Microbiol. Infectol.**, 2: 202-208, 1996.

BOW EJ. Invasive fungal infection in haematopoietic stem cell transplant recipients: epidemiology from the transplant physician's viewpoint. **Mycopathologia.** 2009 Dec;168(6):283-97.

BRANCH, R. A. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment: A review on the use of sodium supplementation. **Arch. Intern. Med.**; 148: 2389-2394, 1988.

BUGNO, A. et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 40-5, 2006

CAMPBELL, B. C.; CHAN, K. L.; KIM, J. H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal 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.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. V **Rev Iberoam Micol**, 23:39-49, 2006.

CAVALCANTI, A.L. et al. Atividade antifúngica in vitro de enxaguatórios bucais sobre *Candida spp*. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v.38, n. 5, p. 313-317, set./out. 2009.

CHAVES, G. M.; CAVALVANTI, M. A.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 197-202, 2003.

CHOUKRI, F; BENDERDOUCHE, M; SEDNAOUI, P. *In vitro* susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida spp.* to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents. **J Mycol Med**. 24, 303—307, 2014.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. Approved standard M27-A3. **Clinical Laboratory and Standards Institute**. 2012. Wayne, PA

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. **Rev Soc Bras Med Trop** 36: 599-607, 2003.

COLOMBO, A.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. and the Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**44-8: 2816-2823, 2006.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS Microbiol. Lett.**, 189: 115-20, 2000.

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. **J Oral Pathol Med**, v.23, p. 130-132, 1994.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. **SENTRY**

Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. **Internat.Jour. of Antimicrob Ag.** 20: 412-418, 2002.

DORE G J, COOPER D A. "HAART" firsty decade: success brings further challenges. **Lancet** 368 (9534): 427-428, 2006.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature** 430(6995), 35–44 (2004).

EDLIND, M. P.; SMITH, W. L.; EDLIND, T. D.. Effects of Cetylpyridinium Chloride Resistance and Treatment on Fluconazole Activity versus *Candida albicans*. **ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER.** p. 843–845 Vol. 49, No. 2. 2005.

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

EPSTEIN JB, PEARSALL NN, TRUELOVE EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. **J Clin Microbiol.** 1980; 12(3): 475-6.

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

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

FERREIRA, A.F.,MACHADO, N.A.G., STRINI, P.J.S.A., NETO, A.J.F., MAGALHÃES, D. **Agentes antissépticos e enxaguatórios na odontologia.** Disponível em: <https://ss14799.websiteseuro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/SA08-21014.PDF>> Acesso em: 10 de setembro 2014.

GARNACCHO-MONTEIRO, J.; DÍAZ-MARTÍN, A.; GARCÍA-CABRERA, E.; PIPAON, M. R.; HERNÁNDEZ-CABALLERO, C.; AZNAR-MARTÍN, J.; CISNEROS, J. M.; ORTIZ-LEYBA, C. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, 54: 3149-3154, 2010.

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

GIANNINI, P. J.; SHETTY, K. V. Diagnosis and management of oral Candidiasis. **Otolaryngol Clin N Am.**, v.44, p.231-240, 2011.

GISSONI, M.; TAVARES, E.; MARTINEZ, H. Soluções químicas para uso tópico bucal – classificação e advertências. **Rev Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v.65, n.1, p.36-41, 2008.

GIULIANNA, G.; PIZZO, G; MILICI, M.E.; GIANGRECO, R.G. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.87, n.1, p. 44-49, 1999.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, 12(4): 501-517, 1999.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

GORMAN, S.P.; MCCAFFERTY, D.F.; WOOLFSON, A.D. A comparative study of the microbial antiadherence capacities of three antimicrobial agents. **J Clin Pharm Ther**, v.12, p. 393-399, 1987.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infect. Dis. Spec. Edit.**, 5:65-70, 2002.

GULSHAN, K.; SCHMIDT, J.A.; SHAHI, P.; MOYE- ROWLEY, W. S.; Evidence for the bifunctional nature of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase: role in *Pdr3*-dependent retrograde regulation of *PDR5* expression. **Mol. Cell Biol.**28, 5851–5864, 2008.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers- The role of phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophysical Chemistry**, v.123, p. 154- 161, 2006.

HALL, Gerri S. Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents. Humana Press. 2012.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species an in vitro susceptibilities f isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 1519-1527, 2004.

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. **Int J Dent Hyg**, v.6, p. 290-303, 2008.

HOSPENTHAL, D., R.; RINALDI, M., G. **Diagnosis and Treatment of Human Mycoses**. Estados Unidos da América: Humana Press Inc. 2008.

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

JEU, L.; PIACENTI, F. J.; LYAKHOVETSKIY, A. G.; FUNG, H. B. Voriconazole. **Clin. Ther.**, 25: 1321-1381, 2003.

JOKLIK, W. K.; WILLWTT, H.P.; AMOS, D. B.; WILFERT, C. M. **Zinsser Microbiologia**. 20^a ed. Buenos Aires: Editora Panamericana, 1995.

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, 2000.

KATIYAR, S.; PFALLER, M.; EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50: 2892-2894, 2006

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; KELLY, D. E. Mode of action and resistance to azole antifungal associated with formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)dien-3 α ,6 α -diol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; 207: 910-915, 1995.

KOCAK, M. M., OZCAN, S., KOCAK, S., TOPUZ, O., ERTEN, H. Comparison of the Efficacy of Three Different Mouthrinse Solutions in Decreasing the Level of Streptococcus Mutans in Saliva. **Eur J Dent.**, Mumbai, v. 3, n. 1, p. 57–61, 2009.

KROG-MADSEN, M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clin. Infect. Dis.** 42: 938-944, 2006.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 2002. 123-169, 252-340, 616-635 p.

LODI G, TAROZZI M, SARDELLA A, DEMAROSI F, CANEGALLO L, DI BENEDETTO D, CARRASSI A. Miconazole as adjuvant therapy for oral lichen planus: a double-blind randomized controlled trial. **Br J Dermatol.** 2007; 156(6): 1336-41.

MAEKAWA, L.E., BRIGHENTI, F.I., LAMPING, R., OLIVEIRA, L., MARCACCI, S., KOGA-ITO, C.Y. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara. V.39, n.1, p. 15-19, Jan./fev. 2010.

MARINHO B. V. S.; ARAÚJO A. C. S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **Int J Dent**, Recife, v. 6, n. 4, p.124-131, 2007.

MASSONET, C.; VAN ELDERE, J.; VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of Vitek 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **J Clin Microbiol.** 42:2209-2211, 2004.

McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infect Genet Evol.** 2013 Nov 19;21C:166-178.

MEDOFF, G., Kobayashi, G.A. The polyenes. In: Speller, D.C.E. (Ed.). **Antifungal chemotherapy**. John Wiley & Sons 1980; 3-33.

MEILLER, T. F.; HUBE, B.; SCHILD, L.; SHIRTLIFF, M. E.; SCHEPER, M. A.; WINKLER, R.; TON, A.; JABRA-RIZK, M. A. A novel immune evasion strategy of

***Candida albicans*: proteolytic cleavage of salivary antimicrobial peptide.** Plos one, v. 4, i.4, e5039, doi:10.1371/journal.pone.0005039, 2009.

MISHRA, N.N., PRASAD, T., SHARMA, N., PAYASI, A., GUPTA, D.K., SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species – a review. **Acta Microbiol Immunol Hung.** V.54, n.3, p.201-235, 2007.

MOREIRA, A.C.A., PEREIRA, M.H.Q.; PORTO, M.R.; ROCHA, L.A.P.; NASCIMENTO, B.C.; ANDRADE, P.M.. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Rev Ciênc Méd Biol**, Salvador, v.8, n.2, p. 153-161, 2009.

MUKHERJEE, P.K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M.A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin Microbiol Reviews** 18: 163-194, 2005.

NAKAYAMA, H.; NAKAYAMA, N.; ARISAWA, M.; AOKI, Y. *In vitro* and *in vivo* effects of 1 α -desmethylase (ERG 11) depletion in *Candida glabrata*. **Antimicrob Agents Chemother.** 45: 3037-3045, 2001.

NASCIMENTO A. P., FARIA, G., WATANABE, E., ITO, I.Y.. Efficacy of mouthrinse spray in inhibiting cariogenic biofilm formation on toothbrush bristles. **Braz J Oral Sci**, Piracicaba, v. 7, n. 24, p. 1989-1992, 2008.

NEVILLE, B. W. DAMM, D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E.. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, p. 183-192, 2004.

OLIVER DE, SHILLITOE EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. **J Oral Pathol**. 1984; 13(3):265-70.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN JR, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS JR, J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, 48: 503-535, 2009.

PARASKEVAS, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. **Int J Dent Hyg.**, 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 STDs**, v.22, n.8, p. 613-618, 2008.

PATIL, Shankargouda; RAO, Roopa S.; MAJUMDAR, Barnali; ANIL, Sukumaran. Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. **Frontiers in Microbiology**. V. 6, Artigo 1391. 2015.

PERLIN, David S.. **Echinocandin Resistance, Susceptibility Testing and Prophylaxis: Implications for Patient Management**. NIH Public Access. *Drugs*. 2014; 74(14): 1573–1585. 2014.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections, epidemiology, diagnosis and treatment. **Med. Mycol.**, 45: 321-346, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J Clin Microbiol**, 39: 3254-3259, 2001.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **J Clin Microbiol**, 41:5729-5731, 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J. Clin. Microbiol.** 42: 4419-4431, 2004.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systematically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.** 42: 3142-3146, 2004.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards Institute broth microdilution method. **J. Clin. Microbiol.** 43: 3807-3810, 2005.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.** 20: 133–163, 2007.

PFALLER M.A., Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences of treatment. **Am J Med.** 125: S3-S13, 2012.

PFALLER M A, CASTANHEIRA M, LOCKART S R, AHLQUIST A M, MESSER A S, JONES RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **J Clin Microbiol.** 50: 1199-1203, 2012.

QUINDÓS, G.; CARRILO-MUÑOZ, A. J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Actividad antifúngica *in vitro* de voriconazol: Nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Rev. Iberoam. Micol.**, 24: 198-209, 2007.

RAMAGE, G. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** V.111, p.456-460, 2011.

RAMAGE G, RAJENDRAN R, SHERRY L, WILLIAMS C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.** 2012: 528521. doi:10.1155/2012/528521.

RENTON HARPER, P., ADDY, M., MORAN, J., DOHERTY, F.M., NEWCOMBE, R.G.. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. **J Periodontol**, v.67, n.5, p. 486-489, 1996.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T.J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M .A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14:643-658, 2001.

ROCHA ARA, SOARES CL, PEREIRA SLS, ROCHA MMNP. Efeito de diferentes agentes químicos sobre microrganismos de biofilme supragengival: estudo experimental *in vitro*. **UFES Rev Odontol**. 10 (2):27-30, 2008.

RODRIGUES, C.F.; S. Silva; M. Henriques. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

ROSATO, A.; VITALI, C.; PIARULLI, M.; MOZZOTTA, M.; ARGENTIERI, M. P.; MALLAMACI, R. *In vitro* synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida species*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 972-975, 2009

RUAN, S. Y.; HSUEH, P. R.. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. **J. Formos. Med. Assoc.**108: 443–451, 2009.

RUHNKE, M.; EIGLER, A.; TENNAGEN, I.; GEISELER, B.; ENGELMANN, E.; TRAUTAMANN, M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngealcandidosis and human immunodeficiency virus infection. **J Clin Microbil**. 32: 2092-2098, 1994.

RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; MORSCHHAUSER, J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in patient with AIDS, **J Antimicrob Chemotherapy**. 46: 291-295, 2000.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BÇACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrob Agents Chemotherapy**. 50: 2009-2015, 2006.

SATHLER LWL, FISHER RG. O efeito anti-placa do triclosan contido em dentifrícios. **Revista Periodontia**, p.267-272, 1996.

SAFRAN, D. B.; DAWSON, E. The effect of empiric and prophylactic treatment with fluconazole on yeast isolates in a surgical trauma intensive care unit. **Arch Surg**. 132: 1184-1188, 1997.

SALIM, N.; MOORE, C.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITE, J.; RAUTEMAA, R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida spp*. **Int J Antimicrobial Agents** 41, 65-69; 2013.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev Iberoam Micol**, 17: 13-81, 2000.

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. **Helv Odontol Acta.**, v.6, p.6-9, 1962.

SCHUMAN, P.; SOBEL, J. D.; OHMIT, S. E.; MAYER, K. H.; CARPENTER, C. C.; ROMPALO, A.; DUERR, A.; SMITH, D. K.;WARREN, D.; KLEIN, R. S. Mucosal *Candida* colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV EpidemiologyResearchStudy (HERS) Group. **Clin. Infect. Dis.**, 27: 1161-1167, 1998.

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

SEGURA, M. E. **Estudos dos compostos de inclusão tipo hospedeiro--convidado entre a beta-ciclodextrina e a clorexidina: avaliação *in vitro***. 1999, 101f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SEMENOFF SEGUNDO, A., BOSCO, A.F., SEMENOFF, T.A., ROCATTO, E.G., CIRILO, D.M., BUZELLE, S.L., NUNES, S.O.. Efetividade do Gluconato de Clorexidina a 0,12% e do Digluconato de Clorexidina a 2% adquiridos em diferentes dentais e farmácias na cidade de Cuiabá, sobre *Candida albicans*. **Periodontia**, Rio de Janeiro, v. 17, n.1, p. 41-45, 2007.

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

SHRESTHA, A. In vitro antifungal effect of mouth rinses containing chlorexidine and thymol. **J Dent Sci**, v.6, p.1-5, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica À Lus de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pág 265-274, 2004.

SILVA, R. P. P., SIMÕES, R.C.S., MERLINI, S., BASTOS, R.S., TORRES, S.A., BASTOS, J.R.M.. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. **Rev Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v.68, n. 1, p.91-94, 2011.

SOBEL, J.D., FIDEL, P. L. Jr., VAZQUEZ, J. A. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clin Microbiol Rev**, 1999. v. 12. p. 80-96.

SOBEL, J. D. Management of Infections Caused by *Candida glabrata*.**Curr Infect Dis Report**, 2:424-428, 2000.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 752 p.

SULLIVAN, D. J., MORAN, G.P., PINJON, E., AL-MOSAID, A., STOKES, C., VAUGHAN, C., COLEMAN, D.C.. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research** v.4, p. 369-376, 2004.

TEN CATE, J.M., KLIS, F.M., PEREIRA-CENCI, T., CRIELAARD, W., GROOT, P.W.. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **J Dent Res.**, v.88, n.2, 2009.

TERRELL, C.L. **Antifungal Agents**. Part II. The azoles. *Mayo Clin Proc*, 74: 78-100, 1999.

THOMAS, E. Efficacy of two commonly available mouth rinses used as preprocedural rinses in children. **J Indian Soc Periodontics and Prev Dent**, v.29, n.2, p. 113-116, Apr./ Jun. 2011.

THOMPSON, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; VALLOR, A. C.; VILLAREAL, N. C.; LEWIS, J. S.; PATTERSON, T. F. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. **Antimicrob Agents Chemother**. 52: 3783-3785, 2008.

THURMOND JM, BROWN AT, SIMA 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(3): 291-295.

TOBGI, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to chlorhexidine gluconate. **J Med Vet 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. **Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.2, p. 43-52, jul/dez 2000.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S.K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM HOSPITALS. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin Infect Dis**. 35:627-630, 2002.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; TRECARCHI, E. M.; LA SORDA, M.; ROSSI, M.; DE CAROLIS, E.; DE GAETANO DONATI, K.; FADDA, G.; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Fungaemia caused by *Candida glabrata* with reduced susceptibility to fluconazole due to altered gene expression.: risk factors, antifungal treatment and outcome. **J Antimicrob Agents Chemother**. 62: 1379-1385, 2008.

VALE-SILVA, L.A.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; PINTO, E. Antifungal activity of the essential oil of thymus x viciosoi against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species. **Planta Med.**, v. 76, p.882-888, 2010.

VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier - are we there yet? **Medical Mycolgy** 41: 355-368, 2003.

YÉVENES, I. Comparison of mouthrinses containing chlorhexidine and other active agents with chlorhexidine mouthrinse-gel: effects on de novo plaque formation. **Rev Odonto Ciênc**, Porto Alegre, v. 24, n.4, p. 345-348, 2009.

YU, L., LING, G., DENG, X., JIN, J., JIN, O., GUO, N.. In vitro interaction between Fluconazole and Triclosan against Clinical Isolates of Fluconazole – Resistant *Candida albicans* Determined by Different Methods. **Antimicrob Agents Chemother**, July, p. 3609-3612, 2011.

WAHYUNINGSIH, R.; FREISLEBEN, H.; SONNTAG, H.; SCHNTZLER, P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. **J Clin Microbiol.**, 38:3016-3021, 2000.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **J. Med. Mycolgy**. 48: 1-12, 2007.

WEBSTER, J. R.; WEBER, W. S. **Introduction to Fungi**. Cambridge University Press, 3^a ed., New York, 2007.

WILEY, J. & SONS. **Antifungal Chemotherapy**. Ed. Speller, 1980.

WINGETER, M.A., GUILHERMETTI, E., SHINOBU, C.S., TAKAKI, I., SVIDZINSKI, T.I.E.. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.3, p.272-6, 2007.

WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, S. M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. **MMWR Recomm Rep**, 55 [RR-11]: 1-95, 2006

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M.; **Compêndio de Micologia Médica**. PAULA, C. R.; Candidíases, p. 99 – 107. Ed. MEDSI, 1998.

ZANIN, S. M. W., MIGUEL, M. D., BARREIRA, S. M. W., NAKASHIMA, T., CURY, C. D., COSTA, C. K.. Enxaguatório bucal: princípios ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 19-24, 2007.

ZEPELIN, M. B.; KUNZ, L.; CHEL, R. R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROB, U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida spp*. To six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **J. Antimicrob. Chemother**. 60: 424-428, 2007.

ZOMORODIAN K, HAGHIGHI NN, RAJAEI N, PAKSHIR K, TARAZOOIE B, VOJDANI M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Med Mycolgy**. 2011;49:208–11.