

Comparação da atividade antimicrobiana de soluções de peróxido de hidrogênio e malva sobre *Candida albicans*

Comparison of hydrogen peroxide and malva mouthrinses antimicrobial activity on *Candida albicans*

Bruno Mello de MATOS

Camila Porto de DECO

Mestrando em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Luciane Dias de OLIVEIRA

Docente do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Antonio Olavo Cardoso JORGE

Docente da Disciplina de Microbiologia e Imunologia – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Ivan BALDUCCI

Docente da Disciplina de Bioestatística – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

Cristiane Yumi KOGA-ITO

Docente da Disciplina de Microbiologia e Imunologia – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José dos Campos – SP – Brasil

RESUMO

O estudo avaliou a atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sobre *Candida albicans*. Vinte e uma amostras clínicas e uma padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) foram testadas frente à enxaguatórios à base de peróxido de hidrogênio 1,5% e tintura de malva. Solução de gluconato de clorexidina 0,12% foi utilizada como controle positivo e foram obtidos valores para máxima diluição inibitória (MDI) e máxima diluição fungicida (MDF). Foram obtidas diluições seriadas dos produtos (50% a 0,02%), e adicionadas 100µL de suspensão de cada cepa e foram incubadas a 37°C/24h, e a MDI determinada. As amostras foram semeadas em ágar Sabouraud para determinação da MDF. Para a solução à base de peróxido de hidrogênio a MDI=0,78% para 86,35% das amostras e MDF=3,1% para 77,27% das amostras. Para a solução à base de gluconato de clorexidina, a MDI foi de 0,2% e 0,1% para 72,7% das amostras e MDF foi de 1,56% e 0,78% para 90,9% das amostras. Para a solução à base de tintura de malva a MDI foi de 1,56% e 0,78% para 72,72% das amostras e não houve atividade fungicida para 54,54% das amostras. A análise estatística (ANOVA Kruskal-Wallis, $\alpha=5\%$) mostrou diferenças significativas entre os valores médios de MDI ($p=0,000$) e de MDF ($p=0,003$). Concluiu-se que a solução à base de gluconato de clorexidina apresentou melhor atividade antimicrobiana sobre *C. albicans*, seguida pela solução à base de peróxido de hidrogênio. A solução à base de tintura de malva não apresentou atividade fungicida sobre a maioria das cepas de *C. albicans*.

UNITERMOS

Candida albicans ; clorexidina ; peróxido de hidrogênio; malváceas.

INTRODUÇÃO

A candidose é a infecção de origem fúngica mais frequente no ambiente bucal⁶ e a principal espécie envolvida nessa patologia é *Candida albicans*, que tem como principal fator de virulência a capacidade de se aderir às células epiteliais da mucosa³.

Este fungo é oportunista e manifesta-se de forma infecciosa, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, é encontrado na estomatite por prótese e outras patologias bucais^{18,23}. Os métodos químicos atuam como coadjuvantes no controle e prevenção da candidose¹².

A clorexidina é um agente catiônico do grupo das bisguanidas que através de seu mecanismo de ação (alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, precipitação de proteínas, alteração do balanço osmótico, interferência no metabolismo, crescimento e divisão celular e inibição da enzima ATPase)⁷ apresenta um amplo espectro antimicrobiano tanto sobre bactérias quanto sobre fungos. É indicado como método químico de controle de placa e prevenção da gengivite¹⁴.

O peróxido de hidrogênio tem sido defendido por vários anos como um anti-séptico usado para o controle de várias condições bucais. Por ser um desinfetante oxidativo instável, sua ação antimicrobiana se dá pela formação de radicais hidroxila livres, o que é extremamente desfavorável para o crescimento de vários microrganismos, pois ataca a membrana citoplasmática, DNA e outros componentes celulares essenciais¹⁵. Sua aplicação em Odontologia se dá principalmente como complemento ao tratamento da doença periodontal associado à clorexidina, pois além de reduzir o manchamento causado pela clorexidina essa combinação é mais eficiente com relação ao potencial antimicrobiano quando comparado aos efeitos destes anti-sépticos separados^{11,13,22}, podendo ser usado também para descontaminação de reservatórios de água de equipes odontológicas²⁴.

Segundo Navarro García et al.¹⁶ (2003), os fitoterápicos atualmente representam uma alternativa ao tratamento com antimicrobianos, contornando o problema da resistência aos antibióticos atualmente disponíveis e da toxicidade causada pelos antifúngicos, sendo motivos que impulsionam a pesquisa por novos medicamentos à base de fitoterápicos para o tratamento de infecções fúngicas oportunistas.

Na busca por novos fitoterápicos, destaca-se a malva, planta da família *Malvaceae*, muito usada pela medicina popular na América Latina e inclusive

no Brasil por suas propriedades antiinflamatórias e anti-sépticas⁴, além de promover a melhora na cura de feridas²⁵, sendo atualmente empregada na formulação de enxaguatórios e cremes dentais.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade de anti-sépticos bucais à base de gluconato de clorexidina 0,12%, peróxido de hidrogênio 1,5% e tintura de malva (*Malva sylvestris*) sobre cepas de *Candida albicans*.

MATERIAL E MÉTODO

Foram incluídos no estudo vinte e uma amostras clínicas de *C. albicans* provenientes do laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, e uma amostra padrão (ATCC 18804). Os anti-sépticos foram testados frente às amostras de *C. albicans* pelo método da microdiluição, de acordo com Takarada et al.²⁶ (2004). Inicialmente, as amostras dos microrganismos testados foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Foram testados os seguintes anti-sépticos à base de: peróxido de hidrogênio 1,5% (Peroxyl[®], Colgate), tintura de malva (*Malva sylvestris*) (Malvaticin[®], Daudt) e gluconato de clorexidina 0,12%, (Periogard[®], Colgate) através da obtenção de 12 diluições seriadas dos produtos (50% - 0,02%) em caldo RPMI (Inlab, São Paulo, SP), utilizando placas de microtitulação (placas de poliestireno com 96 poços) estéreis e com tampa. Suspensões padronizadas contendo 1×10^6 células por mililitro de cada cepa em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) foram obtidas com auxílio de espectrofotometria (Micronal B-582, $\lambda=530\text{nm}$, $\text{DO}=0,284$), sendo inoculadas 100 μL de cada suspensão em cada poço da placa. Um controle de crescimento e um controle de esterilidade para cada amostra testada foram incluídos. Os testes foram realizados em duplicata e as placas incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Rad 3550) considerando-se a densidade óptica (DO) medida no comprimento de onda de 595nm, de acordo com metodologia proposta por Takarada et al.²⁶ (2004). O valor da máxima diluição inibitória (MDI) foi definido como a maior diluição em que não foi verificado crescimento, correspondendo a $\text{DO}_{595} \leq 0,05$.

A seguir, o conteúdo de cada poço da microplaca foi semeado em duplicata em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA), incubadas a 37°C por 48 ho-

ras para determinação da máxima diluição fungicida (MDF).

Os valores médios de MDI e MDF para cada grupo foram comparados por ANOVA Kruskal-Wallis e teste de Dunn tendo sido adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os produtos testados apresentaram efeito inibitório sobre a maioria das cepas de *C. albicans* avaliadas, sendo que o valor da MDI (Máxima Diluição Inibitória) encontrada para a solução à base de peróxido de hidrogênio 1,5% foi de 0,78% para 86,35% das cepas. Para a solução à base de gluconato de clorexidina 0,12% a MDI encontrada foi entre 0,2% e 0,1% para 72,7% das cepas e para a solução à base de tintura de malva (*Malva sylvestris*) foi entre 1,56% e 0,78% para 72,72% das cepas. A análise dos valores de MDI médios obtidos mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0,000$). Verificou-se que a solução à base de gluconato de clorexidina foi o mais efetiva, apresentando menores valores médios de MDI ($0,21\pm 0,11$) em relação aos demais. As soluções à base de peróxido de hidrogênio ($MDI=0,78\pm 0,21$) e tintura de malva ($MDI=0,92\pm 0,54$) não diferiram entre si.

O valor da MDF (Máxima Diluição Fungicida) para a solução à base de peróxido de hidrogênio 1,5% foi 3,1% para 77,27% das cepas. Para a solução à base de gluconato de clorexidina 0,12% foi entre 1,56% e 0,78% para 90,9% das cepas e a solução à base de tintura de malva (*Malva sylvestris*) não apresentou ação fungicida para apenas 54,54% das cepas. A análise dos valores de MDF obtidos para os grupos diferiram estatisticamente ($p=0,003$). O teste de Dunn demonstrou que a solução à base de gluconato de clorexidina apresentou valores de MDF médios ($1,53\pm 1,20$) menores em relação à solução à base de peróxido de hidrogênio ($3,63\pm 1,31$) e a solução à base de tintura de malva ($12,50\pm 14,94$).

DISCUSSÃO

O peróxido de hidrogênio tem sua ação antifúngica discutida na literatura, pois apresenta resultados controversos. No presente trabalho, a solução comercial à base deste agente apresentou atividade fungicida dependente da dose. Segundo Rosenthal et al.¹⁹ (1999), o peróxido de hidrogênio 3% foi efetivo contra *C. albicans* na desinfecção de lentes de

contato, resultado apoiado pelo trabalho de Modesto et al.¹⁵ (2000), que obteve resultados significativos do peróxido de hidrogênio 3% sobre *C. albicans* in vitro e sobre biofilme dentário. Szymańska²⁴ (2006), que analisou o efeito do peróxido de hidrogênio 6% na desinfecção de equipos odontológicos encontrou também significativa redução no número de leveduras do gênero *Candida*. Isso contraria os resultados de Pitten et al.¹⁷ (2003) e Théraud et al.²⁷ (2004), pois segundo os autores, o peróxido de hidrogênio 3% não foi efetivo contra *C. albicans*. Já Ferguson et al.¹⁰ (2002) observaram a efetividade do peróxido de hidrogênio em uma concentração bem maior, 30%, e concluíram que nessas condições a concentração inibitória mínima foi de 234 µg/mL.

O poder antimicrobiano da clorexidina sobre *Candida* spp. tem sido relatado na literatura^{5,6,20,21,23,27}. Fato confirmado em nosso estudo, devido à ação microbiana do enxaguatório à base de gluconato de clorexidina sobre aproximadamente 90% das amostras analisadas. O referido enxaguatório apresentou atividade antifúngica superior às demais substâncias testadas. Azevedo et al.¹ (1999), também estudando a ação do gluconato de clorexidina 0,12% sobre *Candida* spp., encontraram resultados variados, obtendo a diluição inibitória mínima do colutório, que foi de 1:160 para 60% das cepas, sendo que para *C. albicans* a concentração inibitória variou entre 1:100 e 1:160 para 77,4% das cepas. No estudo de Candido et al.² (1996) todas as cepas de *C. albicans* avaliadas foram sensíveis ao gluconato de clorexidina 0,12% na concentração de 6,4 µg/mL, enquanto Ferguson et al.¹⁰ (2002) avaliaram a efetividade do digluconato de clorexidina 20% sobre *C. albicans* e observaram que a mínima concentração inibitória para a levedura foi menor que 0,63 µg/mL.

Shurrab²⁰ (2006), avaliando também o gluconato de clorexidina, em concentrações diferentes: 2%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,05% encontrou a concentração inibitória mínima de 0,5% para o mesmo microrganismo avaliado em nosso trabalho. Esta concentração foi duas a cinco vezes maior que a máxima diluição inibitória encontrada em nosso estudo.

Além do poder microbiana, Pizzo et al.¹⁸ (2001) relatam que o gluconato de clorexidina em concentrações subinibitórias pode modular a colonização por *Candida* spp. in vivo por causar alterações na superfície das células epiteliais da mucosa bucal, reduzindo assim a aderência dessas leveduras. A efetividade deste agente como antimicrobiano foi também confirmada por Estrela⁸ (2000), que demonstrou a efetividade de

uma solução irrigadora de canais radiculares, à base de digluconato de clorexidina a 2%, sobre *C. albicans*. Neste experimento foi realizado teste de exposição direta e a efetividade do antimicrobiano foi comprovada em todos os tempos testados: 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, sendo que a concentração inibitória mínima do agente foi igual a 0,02%. Farias et al.⁹ (2003) avaliaram in vitro da ação antifúngica do digluconato de clorexidina a 0,2% em relação à nistatina usando metodologia diferente dos demais estudos. Os autores não obtiveram resultados a partir da concentração inibitória mínima, mas através da formação ou não de halo de inibição. Para tanto os autores semearam uma suspensão de *C. albicans* em ágar BHI e obtiveram um halo de inibição de 27 mm para clorexidina e 17 mm para nistatina, concluindo maior atividade antifúngica do primeiro produto testado.

A atividade antibacteriana da *Malva sylvestris* é relatada na literatura^{4,16}. Segundo de Souza et al.⁴ (2004), essa planta é ativa contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, em seu estudo porém, o extrato etanólico de *Malva sylvestris* não foi efetivo contra *C. albicans*. Este dado concorda com o estudo de Navarro García et al.¹⁶ (2003) em que o extrato etanólico de uma outra espécie do gênero

Malva, *Malva parviflora*, também não foi efetivo contra o mesmo microrganismo e é corroborado pelos resultados do nosso estudo, onde o enxaguatório à base de tintura de *Malva sylvestris* não apresentou atividade fungicida sobre a maioria das amostras testadas. Já no estudo de Candido et al.² (1996), todas as cepas de *C. albicans* foram inibidas na concentração de 25,6µg/mL de um enxaguatório bucal contendo malva. Essa atividade antimicrobiana aumentada em relação ao nosso estudo provavelmente se deve à associação do cloreto de cetilpiridínio ao extrato fluido de malva, presente na formulação do anti-séptico testado por estes autores.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste trabalho concluímos que a solução à base de gluconato de clorexidina teve maior ação inibitória frente *C. albicans* em relação à solução à base de peróxido de hidrogênio e a solução à base de tintura de *Malva sylvestris*. Quanto à atividade fungicida, a solução à base de gluconato de clorexidina também foi mais eficaz, seguida por solução à base de peróxido de hidrogênio e a solução à base de tintura de *Malva sylvestris*.

ABSTRACT

The study evaluated the antimicrobial activity of mouthrinses on *Candida albicans*. Twenty-one clinical isolates and one reference strain of *C. albicans* (ATCC 18804) were tested with 1.5% hydrogen peroxide and malva tincture based mouthrinses. Chlorhexidine gluconate solution (0.12%) was included as positive control and values of maximum inhibitory dilution (MID) and maximum fungicide dilution (MFD) values were obtained. Serial dilutions of the products were obtained, from 50% to 0.02%, and added 100µL of suspension of each strain that were incubated at 37°C for 24h, and the MID was determined. Samples were plated in Sabouraud agar for the determination of MFD. Results obtained for hydrogen peroxide-based solution was 0.78% for MID to most of the isolates (86.35%) and MFD was 3.1% for 77.27% of the samples. For chlorhexidine-based solution, MID was 0.2% and 0.1% for most of the isolates (72.7%) and MFD was 1.56% and 0.78% for 90.9% of the strains. For malva tincture-based solution, MID values were between 1.56% and 0.78% for 72.72% of the isolates and no fungicide activity for 54.54% of the isolates was observed. Statistical analyses of the results (ANOVA Kruskal-Wallis, $\alpha=5\%$) showed significant differences among the mean values of MID ($p=0.000$) and of MFD ($p=0.003$). It could be concluded that chlorhexidine gluconate-based solution showed the best antimicrobial activity on *C. albicans*, followed by hydrogen peroxide-based solution. Malva tincture-based solution did not show fungicide activity on most of the *C. albicans* isolates tested.

UNITERMS

Candida albicans; chlorhexidine; hydrogen peroxide; malvaceae.

REFERÊNCIAS

- Azevedo RVP, Komesu MC, Candido RC, Salvetti C, Rezende FHC. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. *Rev Microbiol*. 1999 Dec;30(4):335-41.
- Candido RC, Azevedo RVP, Ito IY. Determination of the minimal inhibitory concentrations of Cepacol, Malvona and Periogard in *Candida albicans* strains isolated from oral cavity. *Rev Odontol UNESP*. 1996 Jan-Jun;25(1):79-84.
- Chiang LY, Sheppard DC, Bruno VM, Mitchell AP, Edwards JE Jr, Filler SG. *Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*. 2007 Jan;9(1):233-45.
- de Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2004 Jan;90(1):135-43.
- Do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res*. 2004 Jul-Sep;18(3):242-6.
- Ellepola NA, Samaranyake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis*. 2001 Jan;7(1):11-7.
- Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*. 2003 Jul;14(1):58-62.
- Estrela CRA. Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares [dissertação]. Goiânia: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás; 2000.
- Farias NC, Buffon MM, Cini R. In vitro evaluation of antifungal action of chlorhexidina digluconate and nystatin on the growing control of *Candida albicans*. *Visão Acadêmica*. 2003 Jul-Dec;4(2):83-8.
- Ferguson JW, Hattton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod*. 2002 Feb;28(2):68-71.
- Lee SY. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. *J Oral Sci*. 2001 Mar;43(1):1-7.
- Lima KC, Neves AA, Beyruth JB, Magalhães FAC, Uzeda M. Levels of infection and colonization of some oral bacteria after use of NaF, chlorhexidine and a combined chlorhexidine with NaF mouthrinses. *Braz J Microbiol*. 2001 Jun;32(2):158-61.
- Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. Hydrogen peroxide: a review of its use in Dentistry. *J Periodontol*. 1995 Sep;66(9):786-96.
- Menendez A, Li F, Michalek SM, Kirk K, Makhija SK, Childers NK. Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Feb;20(1):31-4.
- Modesto A, Lima KC, de Uzeda M. Effects of solutions used in infants' oral hygiene on biofilms and oral microorganisms. *ASDC J Dent Child*. 2000 Sep-Oct;67(5):338-44.
- Navarro García VM, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios MY, Zepeda G, et al. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003 Jul;87(1):85-8.
- Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect*. 2003 Oct;55(2):108-15.
- Pizzo G, Giuliana G, Milici ME, D'Angelo M. Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Clin Oral Investig*. 2001 Sep;5(3):172-6.
- Rosenthal RA, Buck S, McAnally C, Abshire R, Schlech B. Antimicrobial comparison of a new multi-purpose disinfecting solution to a 3% hydrogen peroxide system. *CLAO J*. 1999 Oct;25(4):213-7.
- Shurrab MY. Antimicrobial efficiency of some antiseptic products on endodontic microflora isolated from gangrenous pulp tissue. *J Contemp Dent Pract*. 2006 Sep;7(4):53-62.
- Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 May;97(5):632-41.
- Steinberg D, Heling I, Daniel I, Ginsburg I. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Rehabil*. 1999 Feb;26(2):151-6.
- Suci PA, Tyler BJ. Action of chlorhexidine digluconate against yeast and filamentous forms in an early-stage *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3522-31.
- Szymańska J. Antifungal efficacy of hydrogen peroxide in dental unit waterline disinfection. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(2):313-17.
- Tadeg H, Mohammed E, Asres K, Gebre-Marian T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J Ethnopharmacol*. 2005 Aug;100(1-2):168-75.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Feb;19(1):61-4.
- Théraud M, Bédouin Y, Guiguen C, Gangneux JP. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbiol*. 2004 Oct;53(Pt 10):1013-8.

Recebido em 29/05/08
Aprovado em 26/03/09

Correspondências:
Cristiane Yumi Koga-Ito
Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777
São José dos Campos
12.245-000
email: cristiane@fosjc.unesp.br