



AÇÃO ANTIFÚNGICA DA CLORAMINA T EM CEPA DE *CANDIDA ALBICANS*

RANGEL, M.L.R.¹

VANDERLEI, J.M.T.M.M.¹

VANDERLEI, A.C.Q.¹

SANTOS, T.K.G.L.¹

CARLO, F.G.C.²

CASTRO, R.D.³

¹Professoras Mestras do Curso de Odontologia do IESP;

²Professora da Universidade Federal de Juiz de Fora;

³Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

mariannerangel01@gmail.com

RESUMO: Diante do evidente crescimento do número de patógenos resistentes aos antifúngicos atualmente utilizados, esse estudo objetivou avaliar a susceptibilidade da *Candida albicans* (CBS 562) à cloramina T. Para tanto, foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) a partir da técnica da microdiluição, em meio de cultura Sabouraud dextrose, duplamente concentrado, utilizando-se microplacas com 96 poços. Também foi verificada a possível ação da cloramina T sobre a parede celular fúngica a partir do acréscimo do Sorbitol ao meio de cultura. Foram realizados controles de viabilidade das cepas e esterilidade do meio de cultura. A nistatina foi utilizada como controle positivo e os ensaios foram realizados em triplicata. A leitura para determinação da CIM foi feita a partir do método visual associado ao uso do corante, 2, 3, 5 trifetil cloreto de tetrazólio (TCT). A cloramina T apresentou CIM e CFM de 500 µg/mL sobre a cepa investigada. A nistatina demonstrou ação sobre *C. albicans* à CIM e CFM com concentração de 1,56 µg/mL. Os resultados da microdiluição com sorbitol sugerem que um dos mecanismos de ação da cloramina T seja através da parede celular fúngica, uma vez que o teste apresentou a CIM de 1000 µg/mL. Dessa forma, pode-se concluir que a cloramina T apresentou atividade antifúngica sobre *C. albicans* e que um dos seus mecanismos de ação pode estar relacionado com a parede celular fúngica.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Testes de Sensibilidade Microbiana, Nistatina

Abstract

According to the increasing of resistant pathogens to antifungal agents currently used, this study evaluated the susceptibility of *Candida albicans* (CBS 562) to chloramine T. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were investigated by microdilution test using Sabouraud Dextrose medium, concentrated twice,



using 96-well microplates. The possible mechanism action of chloramine T on the wall of fungal cell was also evaluated by addition of sorbitol into the culture medium. The control of viability of the strain and the control of sterility of the culture medium were performed. Nystatin was used as a positive control and all tests were conducted in triplicate. The reading for MIC determination was made from the visual method associated with the use of the dye 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TCT). The chloramine T showed MIC and MFC of 500 $\mu\text{g/mL}$ against the strain investigated. The MIC and MFC of Nystatin against *C. albicans* were 1.56 $\mu\text{g/mL}$. The results using sorbitol microdilution test suggest that one of the mechanisms of action of chloramine T can be on the wall of fungal cell, since the concentration obtained was 1000 $\mu\text{g/mL}$. Thus, it can be concluded that the chloramine T showed antifungal activity against *C. albicans* and that one of its mechanisms of action may be related to the fungal cell wall.

Key-words: *Candida albicans*, Microbial Sensitivity Tests, Nystatin

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um patógeno oportunista de forma comensal e é a maior causa de infecções fúngicas em humanos. Estas infecções normalmente ocorrem como consequência de uma alteração na resposta imunológica e virulência de *C. albicans*, que apresenta considerável plasticidade morfológica (MONGE; ROMANPLA, 2006). Clinicamente, a doença pode surgir como manifestações em mucosas até quadros sistêmicos, com a invasão de diversos órgãos. As mucosas oral, vaginal e esofágica são as mais acometidas em quadros de candidose (GUAMARRA et al., 2010; POZZATTI et al., 2008).

Em indivíduos imunocomprometidos, especialmente os acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), cerca de 74% apresentam lesões na mucosa bucal ocasionados por infecções causadas por *Candida* spp. (CAVASSANI et al. 2002; LASKARIS; HADJIVASSILIOV; STRATIGOS, 1992). Ressalta-se que nestes indivíduos a candidose pode funcionar como um marcador da progressão da doença e preditivo para o aumento da imunossupressão (MESQUITA; AGUIAR; TARQUINO, 1996).

O diagnóstico tardio e o número reduzido de classes de antifúngicos terapêuticamente disponíveis favorecem a mortalidade dos indivíduos. Aliado a isso, a resistência fúngica aos agentes disponíveis torna-se um problema para alguns grupos de pacientes, entre eles, os imunocomprometidos (CANNON et al., 2009). Assim, diante do evidente crescimento do número de patógenos resistentes aos antimicrobianos atuais, existe uma clara e emergente necessidade de introduzir novos agentes no arsenal terapêutico (KHAN, 2008; POZZATTI et al., 2008).



O estudo e a descoberta de novos produtos que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca tornam-se fundamentais para a promoção de uma terapêutica eficaz e disponível. Nesse contexto, inclui-se a cloramina T, que é reconhecida como uma substância já amplamente utilizada como desinfetante em diversas aplicações, como: higiene veterinária, aquacultura, processamento de alimentos, áreas de assistência social, torres de resfriamento, entre outras (CALVERT, 1940; MORRIS, 1967). Nas estações de tratamento e sistemas de distribuição de água, a cloramina T é o desinfetante mais utilizado devido sua eficácia antimicrobiana, preço relativamente baixo e por permanecer ativa dentro dos sistemas durante um período de tempo considerável (CALVERT, 1940; MORRIS, 1967). Tem sido utilizada por décadas na área da saúde, como no tratamento de úlceras purulentas na perna com intensa contaminação, como substância antiséptica para materiais, equipamentos e superfícies e no tratamento de queimaduras (DELLABIANCA et al., 1998; FIGGIE; BENISRSCHKE; FRATIANNE, 1982; NAGL et al., 2003)

Na odontologia, uma das suas indicações é como agente de controle químico do biofilme dentário, tratamento de gengivites, controle de halitoses, entre outras aplicações. Além disso, estudos avaliam a aplicabilidade da sua comprovada ação antimicrobiana em diferentes contextos que abrangem a área, como na descontaminação de elementos dentários utilizados em pesquisas, para higienização da prótese e na composição de bochechos e dentifrícios (HALLER et al., 1993; PITTEN; KRAMER, 1999; PANZERI et al., 2009; SOARES et al., 2006). Entretanto, ainda é pouco avaliado na literatura o efeito antifúngico da cloramina T em cepas de *Candida albicans*.

Assim, o propósito deste estudo é avaliar a atividade antifúngica da cloramina T frente a cepa de *Candida albicans* envolvida nas infecções da cavidade bucal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CANDIDA ALBICANS E CANDIDOSE ORAL

A composição da microbiota residente em cada sítio do organismo é influenciada diretamente pelas condições ambientais de cada habitat. Dessa forma, os microrganismos que colonizam a cavidade oral mostram variações locais de acordo com as superfícies (língua, bochechas, dentes), constituindo uma microbiota diversificada, formada por organismos que chegam a apresentar opostas condições de sobrevivência, como aeróbios, microaerófilos, anaeróbios facultativos e estrictos (KROES; LEPP; REALMAN, 1999; MARSH, 2000).



Estudos sugerem que a microbiota influencia na fisiologia do hospedeiro, pois age como uma barreira para espécies exógenas através da competição por nutrientes e por sítios de ligação, pela produção de metabólitos inibitórios e pelo desenvolvimento de um ambiente desfavorável para microrganismos exógenos, contribuindo, assim, para as defesas inatas do organismo (FULLER, 1992; VAN DER WAAIJ; BERGHUIS-DE VRIES ; LEKKERKERK-VAN DER WEES, 1971). Dessa forma, a microbiota estabelece um equilíbrio com o hospedeiro desempenhando papel fundamental no estado de saúde, sendo a doença uma possível consequência da quebra desse equilíbrio naturalmente estabelecido (MARSH, 2000).

Aliado a interrelação microrganismo-hospedeiro, o aumento da prevalência de infecções fatais tem estimulado a investigação no campo da microbiologia. Nesse contexto, é crescente o número de desordens onde infecções por *Candida*, principalmente *C. albicans*, estão associadas, estimulando o interesse por este microrganismo (MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996). Estudos mostram que espécies de *Candida* são as segundas maiores responsáveis pelas infecções causadas por fungo em todo o mundo e que estão entre as quatro espécies responsáveis por mais de 90% de todas as mortes relacionadas à fungos (BROWN et al, 2012). Os primeiros relatos de infecções por *Candida* foram descritos por Galen, quando foi denominada “*ad aphthas albus*”. Existem mais de doze espécies de *Candida* que podem provocar doenças, sendo a *C. albicans* a mais importante por ser considerada mais virulenta para o homem. Outros tipos envolvidos em infecções humanas são a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* e *C. kyfer* (BROWN, 2012; IZIDORO et al., 2012; MCCULLOUGH; ROSS; READE, 1996)

A *Candida albicans* é um fungo oportunista que pode ser componente da microbiota oral normal, estando presente na cavidade oral de até 50% de pessoas sem evidência de infecção (ALMEIDA; SCULLY, 2002). Considerando sua estrutura morfológica, a parede celular do organismo merece destaque por ser essencial para o desenvolvimento da sua patogênese, uma vez que é necessária para seu crescimento (ODDS, 1985), proporciona rigidez e proteção osmótica, e é o local de contato entre o organismo e seu ambiente. Estudos ultra-estruturais da parede celular da *C. albicans* têm indicado uma microarquitetura complexa, com espessura variável, sendo composta por várias camadas, nas quais os principais componentes são polissacarídeos manana, glucana e quitina. O número de camadas e sua morfologia são variáveis e podem ser relacionados com a fase e as condições de crescimento, com a forma e/ou o meio utilizado para o crescimento das células ou com procedimento de fixação (GARZON et al., 1989). É um microrganismo saprófito e dimórfico,



que, na dependência de fatores predisponentes que alteram a integridade orgânica, modificam a sua conformação leveduriforme para uma forma fusiforme, tornando-se patogênico e sendo responsável pela infecção fúngica mais comum em humanos, denominada Candidose bucal (AMATO NETO, 1995; NEVILLE, 2009; RAMOS et al., 1999).

A Candidose pode se desenvolver em pessoas saudáveis, mas o grupo mais acometido são os pacientes imunodeprimidos, dentre os quais destacam-se os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que apresentam como a infecção fúngica mais comum a candidose (CAMPISI et al., 2002). Pacientes que passam por terapia medicamentosa com antibióticos de largo espectro, corticosteróides ou drogas citotóxicas, diabéticos, e mulheres saudáveis que estão grávidas ou tomando contraceptivos orais, também constituem o grupo de risco para o desenvolvimento da candidose (MIRANDA et al., 2009)

A colonização e invasão de *Candida* nos tecidos do hospedeiro podem estar relacionadas a três mecanismos: parede celular, receptores e sítios de ligação e enzimas proteolíticas. A parede celular é a estrutura que faz o contato do microrganismo com o meio, atuando no crescimento celular e regulação osmótica. Os receptores e sítios de ligação presentes na superfície da célula permitem a associação entre o organismo e a célula do hospedeiro, e as enzimas proteolíticas são necessárias para a invasão tecidual (CALDERONE; BRAUN, 1991)

Na cavidade bucal, a candidose pode ser provocada por fatores locais ou sistêmicos. Os fatores locais estão relacionados com, as irritações locais crônicas, próteses mal adaptadas que favorecem o acúmulo e a colonização dos microorganismos e alterações na microbiota. Já os fatores sistêmicos são associados ao uso de drogas, radioterapia, alto consumo de açúcares fermentáveis, displasias do epitélio oral e distúrbios endócrinos e imunológicos (OKSALA, 1990).

Clinicamente, a candidose pode apresentar-se com diferentes padrões, dentre os quais estão o pseudomembranoso, eritematoso, hiperplásico e mucocutâneo, podendo haver associações entre eles (GOULD, 2011; NEVILLE, 2009). A candidose pseudomembranosa é a mais comum, sendo caracterizada pela presença de placas brancas aderentes na mucosa, que podem ser removidas a raspagem deixando uma mucosa subjacente com aspecto normal ou eritematoso. Pacientes relatam sensação dolorosa, queimação na língua e um sabor desagradável, descrito como amargo ou salgado. Crianças também podem ser acometidas, sendo observadas as manchas brancas removíveis sobre as gengivas e mucosa (GOULD, 2011; NEVILLE, 2009).



2.2 AGENTES TERAPÊUTICOS

Para o tratamento das candidoses, agentes terapêuticos contendo azóis e poliênicos têm sido utilizados com eficácia (REX et al., 2000). Entre os azóis destacam-se o Clotrimazol, Cetoconazol e Fluconazol. Já os poliênicos mais aplicáveis são a Nistatina e Anfotericina B (REX et al., 2000).

De acordo com Wingeter et al. (2007), lesões iniciais podem ser tratadas apenas com medicação tópica, sendo indicados o clotrimazol, miconazol gel e nistatina suspensão oral. Já em casos de infecções recorrentes, indica-se drogas de ação sistêmica, entre elas o fluconazol, cetoconazol e itraconazol. Para infecções fúngicas potencialmente fatais, a Anfotericina B endovenosa tem sido a opção de escolha, porém frequentes reações adversas estão associadas ao uso (GOULD, 2011).

Os azóis foram introduzidos no tratamento de micoses cutâneas superficiais a partir da década de setenta. Constituem uma alternativa atraente para tratamento de infecção fúngica invasiva devido ao seu amplo espectro de ação, facilidade de administração e baixa toxicidade (GAVALDÀ; RUIZ, 2003). A lipofilicidade e baixo peso molecular dessas substâncias, permitem a penetração através da parede celular para desenvolver seu mecanismo de ação, inibindo a síntese de ergosterol, um esteróide essencial para manter a permeabilidade e integridade estrutural da membrana celular fúngica (GIMENO-CARPIO, 2006). As principais limitações deste grupo de antifúngicos são suas interações com outras drogas e a possibilidade de ocorrência de resistência secundária (DISMUKES, 2000).

Entre os poliênicos destaca-se a nistatina, antifúngico isolado do *Streptomyces noursei*. Tal droga não é absorvida pelo trato gastrointestinal e quando administrada por via parenteral apresenta elevada toxicidade, limitando o seu uso sistêmico. Dessa forma, é indicada para o tratamento tópico de micoses na pele e mucosas, podendo ser encontrada sob as formas farmacêuticas de suspensões, pomadas e cremes (GIMENO-CARPIO, 2006; SIDRIM; ROCHA, 2012). Os derivados poliênicos são antibióticos com atividade antifúngica, cujo mecanismo de ação consiste na alteração da permeabilidade celular da membrana plasmática da cepa fúngica. Para tanto, a nistatina liga-se ao ergosterol presente nessa membrana, levando à formação de canais que levam ao aumento da permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, à saída de grande quantidade de micromoléculas e eletrólitos do meio intracelular para o extracelular. Tais eventos alteram a homeostase do microrganismo (GAVALDÀ; RUIZ, 2003).



A literatura comprova a ação antifúngica da nistatina sobre várias espécies de *Candida* e demonstram variação da concentração eficaz sobre esses fungos, a depender da cepa e concentração da substância utilizada. Anna et al. (2010) isolaram 56 cepas de *Candida albicans* de 97 pacientes HIV positivos, entre os quais, pacientes que ainda não haviam passado por terapia antifúngica e outros que foram tratados previamente com Nistatina, Itraconazol, Cetoconazol e Clotrimazol. Tais cepas foram testadas frente à Nistatina utilizando a microdiluição, a partir do protocolo preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Considerando todas as cepas testadas, a CIM da nistatina variou de 0,5-2 µg/mL. Alves e Cury (1992), também realizaram a diluição para verificar a CIM da nistatina sobre 108 cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com câncer (60) e sem câncer (48) e obtiveram resultados variando entre 0,25-8 µg/ml. Em outros estudos que utilizaram metodologia semelhante para obter a CIM da nistatina sobre o microorganismo em questão, resultados similares foram encontrados, como nos realizados por Castro e Lima (2011) e Brito et al. (2010). Castro e Lima (2011) avaliaram 9 espécies de *Candida albicans* com resultados da CIM da nistatina variando entre 2-8 µg/mL. No estudo de Brito et al. (2010), 71 espécies de *Candida* foram isoladas de pacientes HIV positivos, sendo 59 delas *Candida albicans*, sobre as quais a nistatina apresentou CIM entre 1-8 µg/mL.

Na terapia antifúngica de infecções mucocutâneas por via sistêmica, o cetoconazol foi um dos primeiros a tornasse disponível, pela capacidade do organismo de absorvê-lo (NEVILLE, 2009). Entretanto, com pouco tempo de introdução desse agente na terapêutica, as experiências clínicas indicaram aumento na concentração inibitória mínima (CIM) necessária para realização de tratamentos prolongados (SMITH et al., 1986). Além disso, seu uso tem sido restringindo devido a necessidade de um ambiente ácido para absorção do medicamento, além da sua toxicidade hepática e de interação medicamentosa com diversos medicamentos (NEVILLE, 2009)

Atualmente, o fluconazol tem sido a droga mais utilizada para o tratamento sistêmico devido sua boa absorção, baixa toxicidade e disponibilidade para o uso oral e endovenoso (WINGETER et al., 2007). Entretanto, tem sido observado que os portadores de HIV/AIDS tratados para candidose orofaríngea com envolvimento esofágico apresentam-se, com frequência, resistentes a este agente antifúngico (SMITH et al. 1986). Em estudo que avaliou 168 amostras clínicas de candidíase oral crônica foi verificado que 31,4% apresentaram-se resistente ao fluconazol (CIM de 19500 µg/mL) (RAUTEMAA et al., 2007). Nesses casos, onde as infecções são recorrentes e não respondem ao Fluconazol, pode ser indicado o



Itraconazol, porém o uso dessa droga tem sido limitado devido sua interação medicamentosa desfavorável (WINGETER et al., 2007).

Apesar da disponibilidade de agentes terapêuticos, a resistência fúngica vem aumentando como consequência do crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente de profilaxia e automedicação (WANNMACHER; FERREIRA, 2007). A diminuição da susceptibilidade de espécies de *C. albicans* e não-*albicans* foi inicialmente relatada em 1970 em pacientes com candidíase mucocutânea crônica com repetidos e prolongados tratamentos (RAUTEMAA et al., 2007).

Smith et al. (1986) apontam que o estudo da resistência das espécies de *Candida* frente aos antifúngicos disponíveis deve levar em consideração: condições clínicas dos pacientes (imunossupressão, possibilidade de interação medicamentosa, presença de abscessos e cateteres); terapia antifúngica (droga, dose, duração, via de administração); análise micológica antes e após o tratamento e o método utilizado para diagnóstico.

Outro fator que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência fúngica é a necessidade de uso prolongado dos agentes antifúngicos. Em estudo que avaliou a terapia antifúngica para tratamento de candidose orofaríngea em 61 pacientes imunocomprometidos, foi verificado que as durações da terapia com clotrimazol, cetoconazol e fluconazol variaram de, respectivamente, 3 a 240, 11 a 44 e 7 a 138 dias (FAN-HAVARD et al., 1991). Segundo Andes et al. (2006), doses administradas frequentemente tendem a impedir a seleção de células resistentes aos antifúngicos. Em contrapartida, regimes posológicos prolongados parecem contribuir para o desenvolvimento de resistência.

Pozzati et al. (2008), relatam que os mecanismos de resistência de *Candida* spp. aos azóis podem ser explicados resumidamente da seguinte forma: o gene EGR11 codifica a enzima alvo para ação do fármaco, lanosterol 14 α -demetilase. Assim, quando esse gene sofre mutação, a enzima alvo passa a não ser reconhecida pelos azóis. Além disso, em células resistentes observa-se um aumento expressivo na expressão dos genes CDR e MDR que codificam bombas de efluxo. Mutações em genes que codificam outras enzimas envolvidas na via da biossíntese do ergosterol, como o ERG3, podem também contribuir para a resistência.

O conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos com a resistência de cepas de *C. albicans* fomenta o desenvolvimento de drogas que possam atuar em outros alvos celulares.



Diante do evidente crescimento do número de patógenos resistentes aos antimicrobianos atualmente utilizados na clínica, existe uma clara e emergente necessidade de introduzir novos agentes antimicrobianos no arsenal terapêutico (KHAN et al., 2009).

2.3 CLORAMINA T

A cloramina T é um sal sintético, denominado N-Cloro-para-Toluenosulfonamida de Sódio, de fórmula molecular $C_7H_7ClNNaO_2S$ (CUNHA, 1952).

Sua síntese consiste em uma combinação química formada pela adição de uma pequena quantidade de amônia em água clorada, que quando em solução aquosa se ioniza, formando 99,6% de íons de cloramina-T ($CH_3-C_6H_4-SO_2-NCl$), íons de hipoclorito (OCIO), ácido hipoclorito (HClO) ou sais deste ácido como NaClO, HClO e NaClO (CUNHA, 1952).

De acordo com o estudo de Dakin et al. (1916), um dos primeiros a descrever suas propriedades, preparo e uso, a cloramina se apresenta como um sólido branco com um leve cheiro de cloro, que pode ser conservada indefinidamente. É muito solúvel em água, suas soluções não possuem cheiro e não mostram nenhuma decomposição significativa depois de mantidas durante vários meses. Não apresenta ação corrosiva nem em soluções concentradas e é praticamente atóxica. Além disso, é menos irritante que o hipoclorito e possui ação germicida tão poderosa quanto ele, quando usados na mesma quantidade contra microrganismos comuns em feridas infectadas.

Estudos demonstram propriedades que podem ser importantes para aplicações práticas da substância na Odontologia, como ação antimicrobiana, alta substantividade e biocompatibilidade (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009; NAGL et al., 2003)

A ação antimicrobiana da cloramina T ocorre pela ação dos derivados cloroativos provenientes da reação de hidrólise deste sal e foi comprovada por vários estudos como os desenvolvidos por Rolland et al. (2007), Panzeri et al. (2009) e Arnitz, Nagl e Gottardi (2009). A boa substantividade da cloramina T foi demonstrada em avaliações como as realizadas por Pitten e Kramer (1999) e Fuursted, Hjort e Knudsen (1997). Esses estudos estão descritos detalhadamente no tópico seguinte.

Nagl et al. (2003), verificaram, *in vitro*, que queratinócitos humanos são capazes de tolerar uma concentração 0,0001 – 0,001% (1 $\mu\text{g/mL}$ – 10 $\mu\text{g/mL}$) da cloramina T sem sofrerem nenhum dano visível. Nesse mesmo estudo, pacientes com úlceras purulentas crônicas na perna foram tratados com cloramina T a 1% (10.000 $\mu\text{g/mL}$) e foi observada uma maior tolerância das células *in vivo* do que na cultura celular. Outra avaliação *in vivo*



realizada com porquinhos-da-índia infectados por *Pseudomonas aeruginosa*, não demonstrou efeitos adversos na cicatrização de feridas cutâneas nas quais a lavagem foi realizada com cloramina T (HENDERSON; LEMING; MELON-NIKSA, 1989)

A cloramina T já é utilizada na composição de dentifrícios, bochechos e de agentes para remoção químico-mecânica da cárie (MIYAGI et al. 2006; WOLFF, 1985). O Papacárie, produto formulado por pesquisadores brasileiros com o objetivo de facilitar a remoção da cárie, possui cloramina T entre os seus constituintes, com a função de complementar a ação bactericida e desinfetante (MIYAGI et al. 2006). Além do uso clínico, possui aplicação em estudos que utilizam elementos dentários extraídos, sendo o agente de escolha de alguns pesquisadores para a descontaminação e controle de infecção desses dentes por não apresentar efeito adverso sobre as fibras de colágeno da dentina (O'BRIEN et al., 1998; SUZUKI; FINGER, 1988). Haller et al. (1993), acrescentaram que dentes armazenados com cloramina T a 1% (10.000 µg/mL) apresentam resultados relacionados a microinfiltração semelhantes a dentes recém extraídos.

Um estudo comparativo foi realizado para verificar a eficiência de dois dentifrícios, um experimental contendo como agente antimicrobiano cloramina-T a 1% (10.000 µg/mL) e outro dentifrício contendo Triclosan (Colgate Total®), na redução de biofilme e na diminuição de sangramento gengival. Foram selecionados 22 pacientes que apresentavam biofilme dentário e gengivite. Um exame clínico inicial foi realizado para verificar o acúmulo de biofilme a partir do índice de placa de Turesky modificado e o índice de sangramento a sondagem. Ao término de 7 dias de uso dos dentifrícios, novo exame foi realizado repetindo-se os índices para serem comparados. Verificou-se que o uso de ambos os dentifrícios causou redução no índice de sangramento à sondagem, porém não reduziram o acúmulo de biofilme dentário (SOARES et al., 2006).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CLORAMINA T NA CAVIDADE BUCAL

Estudos comprovam a ação antimicrobiana da cloramina T sobre microrganismos colonizadores da cavidade bucal. Pitten e Kramer (1999), verificaram a eficácia antimicrobiana de treze substâncias utilizadas como solução para bochecho através da redução da contagem bacteriana salivar coletada de pacientes saudáveis, em diferentes intervalos. Confrontaram-se os resultados das substâncias controle, água destilada e chá de sálvia, com as substâncias testes. Os resultados do estudo classificaram a cloramina T, a 0,25g/100mL (2500



µg/mL), como um antisséptico de ação forte e prolongada, mantendo ação antimicrobiana mesmo após 1 hora da aplicação.

Outra avaliação relacionada ao tempo de ação da cloramina T foi conduzido por Fuursted, Hjort e Knudsen (1997), na qual avaliaram o tempo necessário para haver novo crescimento de microrganismos após o uso de 5 antissépticos sobre nove espécies de bactérias. Detectou-se que o uso da cloramina-T a 0,2% (2000 µg/mL) conduziu a um tempo maior para o novo surgimento de microorganismos comparado a outros antissépticos testados, como clorexidina, iodo povidona e o fenoxietanol. Já a atividade antimicrobiana da cloramina T, avaliada frente à *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC25913), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Serratia marcescens*, foi similar a da clorexidina e do iodo povidona e superior a dos outros antissépticos.

Rolland et al. (2007) avaliaram o uso da cloramina T para desinfecção de dentes extraídos com aplicabilidade em pesquisas científicas. Os elementos dentários foram armazenados em uma solução de cloramina T a 0,5% (5.000 µg/mL), por 48 horas, para uma posterior avaliação da redução da cloramina T e formação do seu metabolito, pTSA, através de uma análise cromatográfica. Para avaliação da atividade antifúngica foram realizadas a CIM e CFM da substância sobre *L. acidophilus*, pela técnica da microdiluição seguida do subcultivo em placas de petri. Os resultados dos testes aplicados demonstraram que a Cloramina T é fungicida frente ao *L. acidophilus* a uma concentração de 0,031% (310 µg/mL).

No âmbito da cirurgia, a cloramina T foi testada quanto ao seu efeito sobre a incidência e magnitude de bacteremia após extração dentária. Foi utilizada solução salina como controle para ser comparada com o iodo povidona, bicarbonato de sódio saturado e cloramina T a 1% (10.000 µg/mL). Uma amostra de 400 pacientes saudáveis foi distribuída igualmente entre os grupos de antissépticos e orientados a utilizarem a solução duas vezes ao dia, por um minuto. Entre o quarto e o sexto dia de pós-operatório os pacientes foram examinados para ser verificada a presença de alveolite. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e as substâncias testes utilizados (SWEET et al., 1985).

Quanto a avaliações que investigaram a ação da cloramina T sobre *C. albicans*, apenas dois estudos podem ser citados.



Em um desses estudos, Panzeri et al. (2009) formularam dois dentifrícios experimentais, um contendo Cloramina T e outro surfactante de flúor (fluorosurfactante), ambos a uma concentração de 0,01% (100 µg/mL), para serem utilizados por pacientes na higienização de suas próteses totais durante 21 dias, com o objetivo de avaliar a ação dos mesmos na remoção do biofilme e quanto a ação antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans* e espécies *Candida*. Uma amostra de 60 usuários foi distribuída igualmente entre três grupos classificados de acordo com a substância utilizada para higienização da prótese: dentifrício com cloramina T, dentifrício com surfactante de flúor e um grupo controle, que utilizou apenas água. Os resultados mostraram que ambos os dentifrícios apresentaram redução significativa do biofilme quando comparados com o controle. Já em relação a ação antimicrobiana, a Cloramina T apresentou resultados mais expressivos que o outro agente frente ao *S. mutans*, porém não promoveu redução estatisticamente significativa frente a *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*.

Já Arnitz, Nagl e Gottardi (2009) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a atividade antimicrobiana entre Cloramina T e a Monocloramina, preparadas em diferentes concentrações. Entre os microrganismos testados foram inclusos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *Candida albicans*. Apesar da monocloramina ter apresentado resultados superiores aos da Cloramina T, todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade a esta. A *C. albicans* sofreu redução de 2 log₁₀ ufc/mL em 30 e 60 minutos, quando em contato com 0,1% (1000 µg/ml) e 0,01% (100 µg/ml) de Cloramina T, respectivamente.

Como a Candidose é uma doença de grande acometimento na cavidade bucal e ainda existem poucos estudos sobre a atividade antimicrobiana da cloramina T em cepas de *C. albicans* torna-se relevante o desenvolvimento de outras investigações com este objetivo.

3 METODOLOGIA

3.1. Delineamento Geral do Estudo

No presente estudo, utilizou-se uma abordagem indutiva, com procedimentos comparativo-descritivos e técnica de documentação direta em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2010).

3.2 Local de realização da pesquisa e materiais



Os ensaios microbiológicos foram realizados no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

3.2.1 Cepa Fúngica

A cepa fúngica utilizada, *C. albicans* (CBS 562), foi gentilmente cedida pela divisão de microbiologia do Centro de pesquisas químicas, biológicas, e agrícolas da Universidade Estadual de Campinas, sendo proveniente da coleção Holandesa CBS (Central Bureau voor Schimmelcultures).

3.2.2 Produtos sintéticos

A cloramina T (Distribuidora de Produtos Científicos Interlab, São Paulo, SP, Brasil – Lote: 834.941), na formulação de pó de N-cloro-para-toluenosulfonamida de sódio foi avaliada neste estudo. A nistatina (farmácia de manipulação Roval, João Pessoa, PB, Brasil - Lote: 295115) foi a droga utilizada como controle positivo.

3.3 Preparo das soluções para os testes microbianos

A cloramina T foi diluída de água destilada estéril com o objetivo de obter uma solução com concentração de 8000 µg/mL de cloramina T. Tal concentração da solução foi selecionada para que a concentração inicial aplicada nos testes da microdiluição fosse de 2000 µg/mL, no primeiro poço da placa.

A solução de nistatina foi preparada em água destilada, para se obter uma solução na concentração de 1600 µg/mL. Com essa concentração da solução, obteve-se uma concentração inicial de 400 µg/mL da nistatina no primeiro poço das placas de microdiluição.

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM da cloramina T foi realizada através da técnica da microdiluição proposta por Ellof (1998). Em uma microplaca estéril de 96, com fundo chato, foram depositados 100 µL de Caldo de Sabouraud Dextrose (CSD) (HIMEDIA®, Curitiba, Paraná, Brasil – Referência: MO33500G) duplamente concentrado. Em seguida, foram inseridos no primeiro poço 100 µL da solução de cloramina T, a uma concentração inicial de 2000µg/mL.

Após a homogeneização da cloramina T com CSD, a diluição seriada foi realizada pela retirada de uma alíquota de 100µL do poço mais concentrado para o depósito no poço



seguinte. Esta diluição foi realizada em 12 poços, de modo que a quantidade final de 100 μ L (do último poço) foi desprezada. A nistatina, utilizada como controle positivo, foi preparada em solução de concentração inicial de 400 μ g/mL, e o mesmo processo de diluição seriada da cloramina T foi realizado. Em seguida, foram inseridos em cada poço 100 μ L de uma suspensão da levedura de *Candida albicans* preparada na concentração de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2002*. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e ao final da diluição têm-se uma redução da concentração da substância de duas vezes a cada poço.

As placas foram incubadas por 24 h à 37 °C. Após este período, foi realizada a leitura para determinar a CIM da Cloramina T, pelo método visual. Dessa forma, é considerada a CIM a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento da cepa em teste (ELLOF,1998).

Para confirmar os resultados obtidos através do método visual, foi acrescido aos poços 10 μ L do corante 2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio (TCT) (Casa do Laboratório, Recife, Pernambuco, Brasil - Lote: 13050671) e a placa foi re-incubada em estufa a 37°C. Tal substância reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, evidenciando a formação ou não de aglomerados de células no fundo dos poços da placa, corando em vermelho as soluções onde há atividade das enzimas desidrogenases, tornando possível distinguir as amostras vivas, daquelas mortas, as quais mantêm a sua cor (DESWAL; CHAND, 1997).

3.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após determinação da CIM, a concentração da substância em teste correspondente à inibitória mínima e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM x 2 E CIM x 4), foram subcultivadas em placas de agar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 horas a 37°C. O mesmo processo foi realizado com a substância controle, a nistatina. As leituras das CFMs foram feitas com base no crescimento dos controles, sendo considerada a CFM a menor concentração da droga que impediu o crescimento visível do subcultivo.

3.6 Ação da Cloramina T sobre a parede celular fúngica.

O sorbitol é um protetor osmótico utilizado para estabilizar os protoplastos dos fungos (PEREIRA, 2009). Quando ele é acrescido ao meio de cultura pode-se verificar a extensão e a capacidade dos danos que os produtos com atividade antifúngica podem produzir nos



componentes da parede celular do fungo. Se o produto teste age de alguma forma sobre a parede celular fúngica, irá causar a lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença do mesmo (PEREIRA, 2009).

A determinação da CIM da cloramina T na presença do sorbitol (Distribuidora de Produtos Científicos Interlab, São Paulo, SP, Brasil – Lote: 837.212) foi realizada pela técnica da microdiluição, como descrito no item 3.4, utilizando placas de microtitulação contendo 96 poços com fundo chato e em triplicata. O sorbitol a uma concentração de 0,8M foi adicionado a 100 μ L do meio líquido CSD.

As microplacas foram semeadas e incubadas a 37°C por 24 horas, quando a leitura pelo método visual foi realizada, seguida do acréscimo do TCT e reincubação por mais 24 horas para nova leitura (FROST et al., 1995).

4 RESULTADO

O teste de CIM mostrou sensibilidade da cepa de *Candida albicans* a uma concentração mínima de 500 μ g/mL da cloramina T (CIM = 500 μ g/mL). A nistatina, utilizada como controle positivo, apresentou ação com a CIM = 1,56 μ g/mL.

O controle de crescimento pela adição do TCT comprovou a viabilidade da cepa utilizada, visto que na ausência de substância, houve multiplicação do microrganismo em todos os poços. Quanto ao controle de esterilidade, no qual apenas o meio foi depositado nos poços, não foi verificada presença de crescimento celular, garantindo que o crescimento observado nos poços com *C. albicans* apresentou a viabilidade apenas desse microrganismo.

A partir da CIM obtida das substâncias avaliadas, o teste de CFM foi aplicado para verificar qual a concentração fungicida para *C. albicans*. Os resultados da CFM da Cloramina T demonstraram que a CIM de 500 μ g/mL foi a mesma concentração da CFM, de modo que a Cloramina T foi fungicida para a *C. albicans* avaliada a partir de 500 μ g/mL. Da mesma forma ocorreu para a Nistatina, a CIM de 1,56 μ g/mL foi a mesma concentração da CFM, indicando que a partir desta concentração a Nistatina foi fungicida para a *C. albicans* avaliada. Os resultados são demonstrados na Tabela 1.

Substâncias	CIM (μ g/mL)	CFM (μ g/mL)
Cloramina T	500	500
Nistatina	1,56	1,56



Tabela 1. Valores ($\mu\text{g/mL}$) da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) da Cloramina T e Nistatina frente a cepa de *C. albicans*.

Os resultados do teste com o acréscimo do sorbitol ao meio para verificar o mecanismo de ação da substância na parede celular do fungo, mostraram um aumento da CIM da Cloramina T para 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2).

	CIM	CIM (SORBITOL)
CLORAMINA T	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$

Tabela 2. Ação da Cloramina T sobre a parede celular da *C.albicans*.

5 DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana da cloramina T foi comprovada em vários estudos nos quais diferentes metodologias, microrganismos e concentrações da substância foram utilizadas (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009; FUURSTED; HJORT; KNUDSEN, 1997; PANZERI et al. 2009; ROLLAND et al., 2006). Sua ação já foi testada frente a bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans*. Entre os fungos, podem ser citados *Aspergillus fumigatus*, *Candida spp.* e *Aspergillus flavus* (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009; FUURSTED; HJORT; KNUDSEN, 1997; PANZERI et al., 2009; ROLLAND et al., 2006). No universo dos microrganismos que podem colonizar a cavidade oral, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram testados frente a diferentes concentrações da Cloramina T. A concentração de 0,003% reduziu a viabilidade destes microrganismos no tempo de 10, 30 e 60 min, respectivamente (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009).

Candida albicans é um microrganismo residente da cavidade bucal, porém fatores sistêmicos, principalmente desordens imunológicas, e fatores locais associados aos uso de próteses e higiene inadequada podem gerar um desequilíbrio na microbiota e favorecer o aparecimento de candidose bucal (BROWN et al., 2012; OKSALA, 1990). Apesar da significância desse microrganismo nas infecções da cavidade oral, poucos estudos com



Cloramina T foram encontrados na literatura avaliando sua atividade antifúngica frente a *C. albicans* (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009; PANZERI et al., 2009)

A CIM encontrada no presente estudo de 500 µg/mL para inibir o crescimento de *C. albicans* pode ser considerada aceitável e moderada para estudos microbiológicos, de acordo com Holetz et al. (2002). Estes autores relataram que concentrações de CIM menores que 100 µg/mL possuem atividade antimicrobiana boa, que a CIM entre 100 a 500 µg/mL pode ser considerada atividade antimicrobiana moderada, de 500 a 1000 µg/mL a atividade antimicrobiana pode ser fraca e acima de 1000 µg/mL a atividade pode ser considerada inativa. Entretanto esses intervalos foram considerados para extratos de produtos naturais, não existindo um padrão para a cloramina T.

Com os estudos microbiológicos já realizados com a cloramina T (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009; PANZERI et al., 2009), observa-se que outras concentrações da mesma foram capazes de sensibilizar o crescimento de *C. albicans*, porém, as diferentes metodologias aplicadas entre os estudos não favorecem o confronto com os nossos resultados. No presente estudo, encontrou-se uma concentração maior da substância (500 µg/mL) para sensibilizar a *Candida albicans* comparado ao estudo de Arnitz, Nagl e Gottardi (2009), no qual 1000 µg/mL (0,1%) da Cloramina T reduziu 2 log₁₀ UFC/mL de *Candida albicans* em 30 min, enquanto a concentração de 100 µg/mL (0,01%) necessitou de 60 min para obtenção do mesmo efeito. Essa diferença na concentração pode ser decorrente da metodologia aplicada, enquanto o presente estudo buscou determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento celular (CIM), o estudo de Arnitz, Nagl e Gottardi (2009) analisou a concentração que causou uma redução de 2 log₁₀ UFC/mL na cultura de *C. albicans*.

Outro estudo avaliou o efeito da cloramina T (0,01%) adicionada a um dentifício comparando-o com um dentifício contendo fluorosurfactante (Panzeri et al., 2009) frente a microrganismos colonizados em próteses utilizadas por pacientes. A ação antimicrobiana do dentifício contendo a cloramina T foi maior comparado ao outro dentifício frente *S. mutans*, após higienização das próteses. Porém, o dentifício de cloramina T não promoveu redução estatisticamente significativa de UFC/mL de *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*. A concentração de cloramina T do dentifício foi menor que a utilizada no presente estudo e não se mostrou eficaz em reduzir UFC/mL de *C. albicans* em próteses. Além disso, em dentifícios outros componentes são adicionados, como detergentes, espessantes, pigmentos, flavorizantes e abrasivos (Panzeri et al., 2009), os quais poderiam interferir na ação



antifúngica da cloramina T em decorrência da substância teste não estar pura e isolada para exercer sua atividade.

A nistatina, substância usada como controle, é um antifúngico poliênico amplamente utilizado para tratamento de infecções fúngicas, sendo evidenciadas pela literatura diferentes concentrações dessa substância capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*, a depender da cepa utilizada, variando de 0,25 a 8 µg/mL (ALVES; CURY, 1992; ANNA et al., 2010; CASTRO; LIMA 2011; BRITO et al. 2010). Portanto, a CIM=1,56 µg/mL encontrada nesse estudo está de acordo com a literatura existente.

O teste da CFM apresentou um resultado relevante ao ser observada a ausência de crescimento no subcultivo das CIM's e das duas soluções mais concentradas em placas de petri, demonstrando que a concentração de 500 µg/mL foi capaz tanto de inibir o crescimento do microrganismo testado, como também foi capaz de matá-lo. Portanto, a cloramina T pode ser considerada fungicida a essa concentração.

Não foram encontrados na literatura outros estudos que avaliassem a CFM contra *C. albicans*, porém, estudos com outros microrganismos também apontaram para o potencial bactericida e fungicida da cloramina T. Rolland et al. (2007), ao obterem um resultado de 0,031% (310 µg/mL) para CIM e CFM da cloramina T frente a bactéria *Lactobacillus acidophilus*, consideraram que valores similares para esses testes demonstram o potencial bactericida da substância. Fursted, Hjort e Knudsen (1997), corroboram com este resultado ao obterem resultados semelhantes para CIM e CFM da cloramina T, frente a nove microorganismos, incluindo *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Serratia marcescens*.

A cloramina T é um componente de cloro ativo, o qual pode destruir os componentes celulares por oxidação (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009). A morte de microrganismos por componentes de cloro ativo ocorre em 3 etapas: (1) formação de uma cobertura de cloro na superfície do microrganismo (pela ligação covalente N – Cl), a qual interfere na virulência, mas não na viabilidade; (2) penetração do agente na célula e (3) destruição da viabilidade dos componentes celulares (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009; GOTTARDI; NAGL, 2005). Porém a taxa de penetração do agente no microrganismo pode variar de acordo com a carga elétrica do mesmo, presença de moléculas hidrófobas e número de camadas de lipídeos da parede celular, bem como relacionado ao peso e tamanho da molécula do agente (ARNITZ; NAGL; GOTTARDI, 2009).



O teste com o Sorbitol acrescido ao meio apontou para um possível mecanismo de ação da cloramina T quando em contato com a *C. albicans*. A partir da comparação dos resultados das microdiluições com e sem o Sorbitol, observa-se que houve crescimento fúngico em um poço a mais na placa de microdiluição onde o protetor de parede celular estava presente, sendo necessário para inibir o crescimento celular o dobro da concentração da cloramina T, CIM=1000 µg/mL. Considerando a ação do sorbitol de proteção da parede celular do microorganismo através da regulação osmótica, bem como o aumento da CIM neste teste, pode-se concluir que um dos mecanismos de ação da cloramina T para sensibilizar a *Candida albicans* é através da parede celular.

Diante da pertinência dos resultados encontrados, além de avaliar a atividade fungistática e fungicida da cloramina T são necessários estudos que avaliem outras propriedades que possam demonstrar sua aplicabilidade na Odontologia, como análises relativas a sua substantividade e toxicologia.

Na literatura, resultados expressivos quanto a substantividade da cloramina T podem ser encontrados. Estudos como o realizado por Fuursted, Hjort e Knudsen (1997), demonstram que uma concentração 0,2% (2000 µg/mL) da cloramina T inibe o crescimento do *Enterococcus fecalis* por 4,2 horas. Rolland et al. (2007), acrescentam que a presença de matéria orgânica acelera a degradação dessa substância.

No estudo realizado por Pitten e Kramer (1999), a cloramina foi comparada com outras doze substâncias utilizadas como enxaguatórios bucais, no qual foi classificada entre as substâncias de forte e longa duração. Devido a essas propriedades, os autores sugerem o seu uso por pessoas imunocomprometidas, que necessitem de uma redução contínua de microorganismos na cavidade oral. Porém ela também pode ser indicada quando se pretende um efeito imediato, por exemplo, como bochecho antes de procedimentos de exodontia.

Quanto a toxicidade da cloramina T, Miyagi et al. (2006) realizaram um experimento no qual células cultivadas da polpa dentária humana foram colocadas em contato indireto e direto com o gel Papacárie®, produto que possui cloramina T a 0,5% (5.000 µg/mL) em sua composição para remoção de tecido cariado. No contato indireto não houve diminuição das porcentagens de viabilidade celular, sendo similares às apresentadas pelo grupo controle, independente do tempo experimental. Já no contato direto, uma pequena redução dessa viabilidade foi constatada, porém após 24 horas a citotoxicidade não foi mais observada, sugerindo que ela existiu apenas durante o contato inicial, quando o produto estava mais ativo. Dessa forma, os autores consideraram o gel de Papacárie® um produto biocompatível.



Porém, a cloramina T estava associada a outros componentes do produto, sendo necessária ainda uma investigação da citotoxicidade e biocompatibilidade da cloramina T isolada com 500 µg/mL.

CONCLUSÃO

- A Cloramina T apresentou ação antifúngica *in vitro* sobre *Candida albicans* com CIM e CFM de 500 µg/mL.
- O ensaio de sorbitol demonstrou que um dos mecanismos de ação antifúngica da Cloramina T pode estar relacionado à parede celular.

Referências

ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Fungal infections of the mouth. [*Brazilian Journal Of Oral Sciences*](#), Piracicaba, v. 1, n.1, p. 19-26, 2002.

ALVES, S. H.; CURY, A. E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de pacientes com com câncer, a antifúngicos poliênicos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 34, n. 3. P. 252-254, 1992.

AMATO NETO, V. **Síndrome da imunodeficiência adquirida: informações básicas**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 1995.

ANDES, D. et al. Impact of Antimicrobial Dosing Regimen on Evolution of Drug Resistance In Vivo: Fluconazole and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2374-2383, 2006.

ANNA, L. M. P. S. et al. Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de *Candida* y su correlación con la respuesta al tratamiento. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 3, p. 237-244, 2010.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 4, n. 165, p. 1-9, 2012.

CALDERONE, R. A.; BRAUN, P. C. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n.1, p. 1-20, 1991.

CALVERT, C.K. Super chlorination. **Water Works Sewerage**, v. 87, p.299–303, 1940.

CAMPISI, G. et al. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus–infected subjects. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 93, n.3, p. 281-286, 2002.



- CANNON, R. D. et al. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.
- CAVASSANI, V. G. S. et al. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 68, n. 5, p. 630-634, 2002.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica**: Norma aprovada – M27-A2, v. 22, n. 15, 2. ed. Pennsylvania, Estados Unidos, 2002a.
- CUNHA, E. S. **Terapêutica: apontamentos para cirurgiões dentistas e estudantes de odontologia**. 3ª Edição. Rio de Janeiro : Científica, 1952. 272 p.
- DAKIN H. D.; COHEN, J. B.; KENYON, J. Studies in antiseptics (II): on Chloramine: its preparation, properties, and use. **BrMed J**, v. 1, p. 160-162, Jan, 1916.
- DELLABIANCA, A. et al. Asthma caused by *p*toluene-*N*-chloro-sulfonamide: observations on a clinical case. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro**, v. 10, n. 4-5, p. 207-210, 1988.
- DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* T.) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, n.1, p.409-17, 1997.
- DISMUKES, W. E. Introduction to Antifungal Drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 653-657, 2000.
- ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.
- FAN-HAVARD, P. et al. Development of Resistance in *Candida* Isolates from Patients Receiving Prolonged Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 11, p. 2302-2305, 1991.
- FIGGIE, H. E.; BENISRSCHKE, S. K.; FRATIANNI, R. B. Chloramine-T-glycerin dressings for burns. **Journal of burn care & research**, v. 3, n. 4, p. 223-225, 1982.
- FROST, D. J. et al. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **J. Antibiotic**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.
- FUURSTED, K.; HJORT, A.; KNUDSEN, L. Evaluation of bactericidal activity and lag of regrowth (postantibiotic effect) of five antiseptics on nine bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Copenhagen S, v. 40, n. 2, p. 221-226, 1997.
- GAVALDÀ, J.; RUIZ, I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección fúngica invasiva por *Candida* spp. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, n. 9, p. 458-508, 2003.



- GAMARRA, S. et al. **Mechanism of the Synergistic Effect of Amiodarone and Fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 54, n. 5, p. 1753-1761, 2010.
- GIMENO-CARPIO, E. Tratamiento tópico de las micosis cutáneas superficiales. ***Med Clin***, Barcelona, v. 126, n. 1, p. 43-46, 2006.
- GOTTARDI W.; NAGL, M. Chlorine covers on living bacteria: the initial step in antimicrobial action of active chlorine compounds. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2005.
- GOULD, D. Diagnosis, prevention and treatment of fungal infections. ***Nursing Standart***, Londres, v. 25, n. 33, p. 38-47, 2011.
- HALLER, B. et al. Effect of storage media on microleakage of five dentin bonding agents. ***Dental Materials***, v. 9, n.3, p. 191-197, 1993.
- HENDERSON, J. D.; LEMING, J. T.; MELON-NIKSA, D. B. Chloramine-T solutions: effect on wound healing in guinea pigs. ***Archives of Physical Medicine and Rehabilitation***, v. 70, n. 8, p. 628-631, ago, 1989.
- HENTGES, D. J. Gut flora and disease resistance. In: FULLER R. ***Probiotics: The Scientific Basis***. 1ª Edição. Londres: Chapman & Hall, 1992. p. 87-110.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- KHAN, R. et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. ***Molecules***, v. 14, n. 2, p. 586-597, 2009.
- KROES, I.; LEPP, P. W.; REALMAN, D. A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 96, n. 25, p. 14547-52, dez, 1990.
- LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Fundamentos de metodologia científica**. 7 ed. São Paulo: Atlas, 2010.
- LASKARIS, G.; HADJIVASSILIOV, M.; STRATIGOS, J. Oral signs and symptoms in 160 HIV-infected patients. ***Journal of Oral Pathology and Medicine***, v. 21, n. 3, p. 120-123, 1992.
- MARSH, P. D. Role of the Oral Microflora in Health. ***Microbial Ecology in Health and Disease***, Salisbury, v. 12, n. 3, p. 130-137, 2000.
- MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. ***International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery***, Munksgaard, v. 25, n. 1, p. 136-144, 1996.



MESQUITA, R. A. et al. R. Candidíase oral na infecção HIV. **Revista do CROMG**, v. 4, n. 1, p. 27-31, 1998.

MIYAGI, S. P. H. et al. Resposta de fibroblastos pulpaes humanos em cultura ao gel de Papacárie ®. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 18, n.3, p. 245-249, set-dez, 2006.

MIRANDA, L. N. et al. Candida colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, n. 1, p. 9-16, 2009.

MONGE, R. et al. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 905-912, 2006.

MORRIS, J.C. Kinetics of reactions between aqueous chlorine and nitrogen compounds. In: FAUST, S. D.; HUNTER, J. V. **Principles and Applications of Water Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1967. p. 23-53.

NAGL, M. et al. Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in comparison with chloramine T for the treatment of chronic leg ulcers with a purulent coating: a randomized phase II study. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 3, p. 590-597, sep, 2003.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2009. p. 213-224.

O'BRIEN, J. A. et al. Shear bond strength of a new dentin bonding restorative system. **Dental Materials**, v. 4, n.4, p. 179-183, Aug, 1988.

OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. [Acta Odontologica Scandinavica](#), v. 48, n. 1, p. 71-74, 1990.

PANZERI, H. et al. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. **Gerodontology**, v. 26, n. 1, p. 23-33, mar, 2009.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton***. [Tese de doutorado]. João Pessoa: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 2009. 33.

PITTEN, F. A.; KRAMER, A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Greifswald, v. 55, n. 2, p. 95-100, abril, 1999.

[POZZATTI, P.](#) et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950-960, 2008.

RAUTEMAA, R. et al. Decreased susceptibility of *Candida albicans* to azole antifungals: a complication of long-term treatment in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-



ectodermal dystrophy (APECED) patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n., 4, p. 889-892, 2007.

REX, J. H. et al. Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 662-678, 2000.

ROLLAND, S. L. et al. Dentin decontamination using chloramine T prior to experiments involving bacteria. **Dental Materials**, v. 23, n.12, p. 1468-1472, dec, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2012. p. 50-62.

SMITH, K. J. et al. Azole resistance in *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, n. 1, p. 133-144, 1986.

SOARES, R.G. et al. Efeito de um dentífrico experimental contendo T-Cloramina na saúde bucal. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 12, p. 32-32, 2006.

SWEET, J. B. et al. Effect of antimicrobial mouth rinses on the incidence of localized alveolitis and infection following mandibular third molar oral surgery. [Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology](#), v. 59, n.1, p. 24-26, 1985.

SMITH, K. J. et al. Azole resistance in *Candida albicans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, n. 1, p. 133-144, 1986.

SUZUKI, T.; FINGER, W. J. Dentin adhesives: site of dentin vs. bonding of composite resins. **Dental Materials**, v. 4, n. 6, p. 379-383, dez, 1988.

WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS-DE VRIES, J. M.; LEKKERKERK-VAN DER WEES, J. E. C. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **Journal Hygiene**, Londres, v. 69, n.3, p. 405-411, set, 1971.

WANNMACHER, L. Antifúngicos. In: WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica para Dentistas**. 3ª Edição. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

WOLFF, L. F. Chemotherapeutic agents in the prevention and treatment of periodontal disease. **Northwest Dent**, v. 64, n. 6, p. 15-24, 1985.