

## SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* ISOLADAS DE PACIENTES COM ESTOMATITE PROTÉTICA

### SUSCEPTIBILITY TO ANTIFUNGAL DRUGS OF *CANDIDA ALBICANS* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH DENTURE STOMATITIS

Jéssica Moreira BATISTA\*  
Esther Goldenberg BIRMAN\*\*  
Arlete Emily CURY\*\*\*

---

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, out./dez. 1999.

Pacientes portadores de próteses totais, apresentam, com freqüência a chamada estomatite protética, com a qual associa-se *Candida albicans* determinando a chamada candidíase eritematosa. Assim, procuramos avaliar a suscetibilidade dessa levedura a agentes antifúngicos. A suscetibilidade de dezenove cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes apresentando estomatite protética foi estudada frente a: um derivado poliênico representado, pela anfotericina B (AnB), e dois derivados azólicos, cetoconazol e miconazol. A atividade antifúngica foi estudada a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), pela técnica de diluição em ágar. Os resultados obtidos, mostraram baixos valores de CIMs e CFMs (< 0,15 µg/ml) para a AnB frente a todas as leveduras. Para o miconazol e o cetoconazol, foram observadas CIMs invariavelmente ≤ 4,00 µg/ml; para as CFMs, foram obtidos valores ≥ 16,00 µg/ml frente a maioria das cepas. Conclui-se que a AnB apresentou maior ação fungicida *in vitro* enquanto os azóis demonstraram ação fungistática mas não fungicida. Acreditamos que a pesquisa de novas drogas, principalmente de uso tópico ainda é necessária, a fim de se tratar, com sucesso, a candidíase eritematosa, comumente observada nas chamadas estomatites protéticas.

UNITERMOS: Candidíase bucal; Estomatite sob prótese; Fungos; Antimicóticos; Anfotericina B; Azóis.

---

## INTRODUÇÃO

Em pacientes portadores de próteses totais, é comum o surgimento de uma condição conhecida internacionalmente como “denture sore mouth” entre outras denominações e, entre nós, conhecida como estomatite protética, freqüentemente associada à presença da candidose eritematosa<sup>17</sup>. Esta localiza-se sob a base da prótese total, mais freqüentemente no maxilar superior, caracterizada por um eritema difuso, ora homogêneo, ora representado por pontos ou áreas focais avermelhados, além de apresentar variadas alterações na textura e superfície da mucosa palatina. Essas reações inflamatórias, podem ou não estar associadas às hiperplasias causadas por uma variedade de fatores

relacionados à prótese, destacando-se: trauma por inadequações e porosidade da base, uso da mesma por tempo prolongado, má higienização, além da ação de bactérias e fungos<sup>4</sup>. Sua freqüência tende a aumentar com a idade e tempo de uso da prótese<sup>5,6,12</sup>. Apesar de muito estudada, a “estomatite protética” permanece, até hoje, tema de controvérsias, mas o papel dos fungos já está bem consolidado<sup>10</sup>.

As candidíases associadas à estomatite protética não são de fácil tratamento. Geralmente, recidivas ocorrem após a interrupção do mesmo, ainda que o trauma causado pela prótese tenha sido eliminado por meio de substituição por nova prótese. Esses problemas, nem sempre graves, representam um desafio na prática estomatológica, face a

---

\* Cirurgiã-Dentista, Mestre em Diagnóstico Bucal; \*\*Professora Titular; \*\*\*Professora Associada - Faculdades de Odontologia e Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

sua freqüência e o pequeno número de drogas antifúngicas disponíveis em nosso meio<sup>15,16</sup>.

A colonização de leveduras na cavidade bucal dá-se à custa da sua capacidade de aderência às células epiteliais. Esta pode ser ampliada no usuário de prótese, visto que a levedura pode aderir intensamente à resina da mesma. Apesar dos numerosos trabalhos publicados, ainda não existe, um consenso sobre qual seria o fator de maior peso na etiologia desses processos, permanecendo muitas indagações a serem elucidadas.

Em nossa experiência, deparamos com diversos casos de estomatite protética, com positividade para *Candida albicans*, apresentando dificuldades no seu tratamento. Em outros casos, houve melhora do quadro clínico, apesar das recidivas freqüentes. Isso nos levou a supor que nem todos os antifúngicos de uso tópico são suficientemente eficazes ou que ainda não podemos tratar os desequilíbrios que favorecem, nestes casos, a manifestação da candidíase bucal.

Apesar do aumento no número de antimicóticos comercialmente disponíveis nos últimos anos, estes ainda encontram-se em desvantagem, quando comparados às drogas antibacterianas. Além disso, a resistência aos antifúngicos, tem representado um grande desafio para a clínica. Frente às dificuldades observadas no tratamento de micoses em alguns grupos de pacientes, recomenda-se, sempre que possível, o isolamento do agente responsável pela infecção e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) das drogas passíveis de utilização.

Visto que ainda não existe um procedimento padrão, mundialmente aceito, para execução de antibiogramas para fungos, pode-se considerar que, métodos padronizados, reprodutíveis e exaustivamente avaliados em laboratórios de referência, devem ser empregados para estudo de antifúngicos.

Propusemo-nos, assim, a avaliar as CIMs e as CFMs de um derivado poliênico, representado pela anfotericina B e de derivados imidazólicos, como o miconazol e cetoconazol, frente a cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de portadores de estomatite protética.

## MATERIAL E MÉTODO

### Casuística – pacientes e microrganismos

Nossa casuística constou de portadores de prótese total, desdentados, que apresentavam estomatite protética no palato, representada por pontos avermelhados ou áreas eritematosas difusas, com alguns casos associadas a processos proliferativos não neoplásicos (hiperplasias fibrosas) da mucosa. A partir dessas amostras, foram isoladas e identificadas 19 cepas de *Candida albicans*, utilizando um protocolo estabelecido da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Essas leveduras foram submetidas a antibiogramas com diferentes antifúngicos, utilizando-se como controle, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763, sensível a agentes poliênicos e *Candida pseudotropicalis* “Carshalton”, sensível a imidazólicos. A manutenção dos microrganismos foi realizada em ágar-Sabouraud dextrose a 30°C, com repiques sucessivos de 15 dias, ou de 24 h quando necessário para preparação do inóculo.

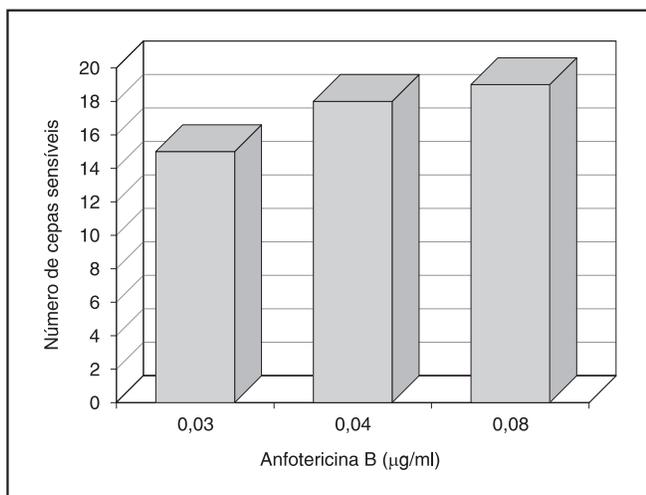
### Drogas e diluições

Para os testes de suscetibilidade foram utilizados três fármacos, gentilmente cedidos pelas respectivas indústrias que comercializam os produtos no Brasil. Essas drogas foram conservadas, sob vácuo, a -20°C e incluíram: anfotericina B\* fornecida sob a forma injetável; cetoconazol e miconazol\*\*, fornecidos sob a forma de pó.

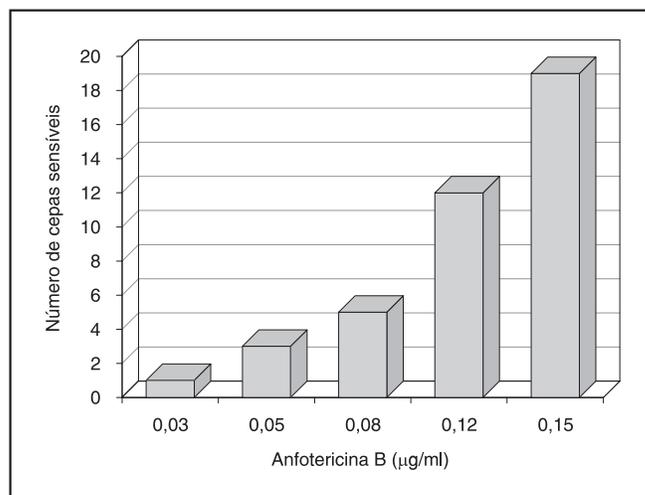
- Anfotericina B - Foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada no frasco-ampola contendo 50 mg de anfotericina B e a mistura foi homogeneizada. A solução resultante foi diluída com YNBG<sup>17</sup> na proporção de 1:4 e a partir desta, foram preparadas diluições seriadas ao dobro, a fim de se obter concentrações finais de 8 µg/ml a 0,015 µg/ml, no teste de concentração inibitória mínima (CIM).
- Azóis: Cetoconazol e Miconazol - O pó foi dissolvido em dimetilsulfóxido (1000 µg/ml). A partir da solução resultante, foram preparadas diluições seriadas ao dobro, em caldo YNBG, obtendo-se concentrações finais variáveis de 32 µg/ml a 0,25 µg/ml, no teste de CIM.

\* Fungizon®, Squibb

\*\* Johnson & Johnson



**GRÁFICO 1** - Número acumulado de cepas de *Candida albicans* sensíveis à CIM de anfotericina B, isoladas de portadores de estomatite protética.



**GRÁFICO 2** - Número acumulado de cepas de *Candida albicans* sensíveis à CFM de anfotericina B isoladas de portadores de estomatite protética.

## Inóculo

A partir de cada cultivo de 24 h a 30°C, foi preparada suspensão com cerca de 10<sup>6</sup> células/ml, em tampão de fosfato com Tween 80. Após homogeneização, a suspensão foi diluída na proporção de 1:50 em caldo YNBG.

## Avaliação da sensibilidade das leveduras aos agentes antifúngicos

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Volumes de 19 ml de ágar YNBG, modificado (1% ágar) foram fundidos e, em seguida, mantidos a 50°C<sup>17</sup>. A cada tubo adicionou-se e 1 ml de uma das diluições da droga em estudo ou, no caso dos controles, 1ml de caldo YNBG ou 1 ml de formaldeído a 0,5%. Cada meio foi plaqueado e, após solidificação, semeado com 5 µl de cada inóculo. As placas foram colocadas em estufa a 30°C por 24 h, antes da leitura da CIM. Foi considerado CIM, a menor concentração do antifúngico que impediu crescimento visível da levedura.

### Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Cada inóculo do teste anterior que não apresentou crescimento e os controles positivos, foram subcultivados em placas de ágar Sabouraud dextrose, devidamente identificados. Após 24 horas de incubação a 30°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles,

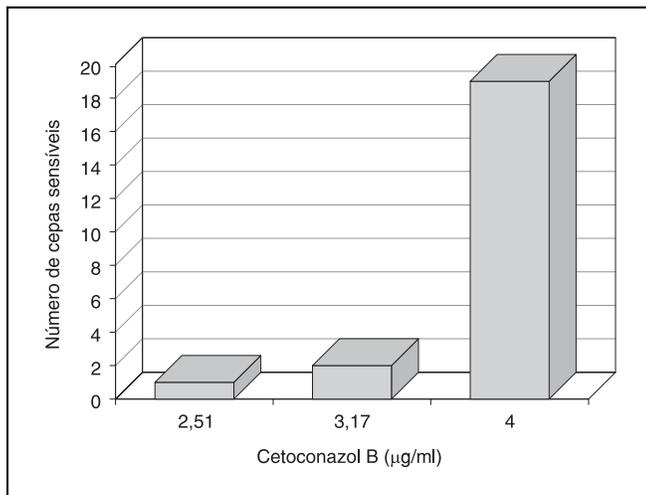
sendo considerada CFM, a menor concentração da droga que impediu crescimento visível do subcultivo.

## RESULTADOS

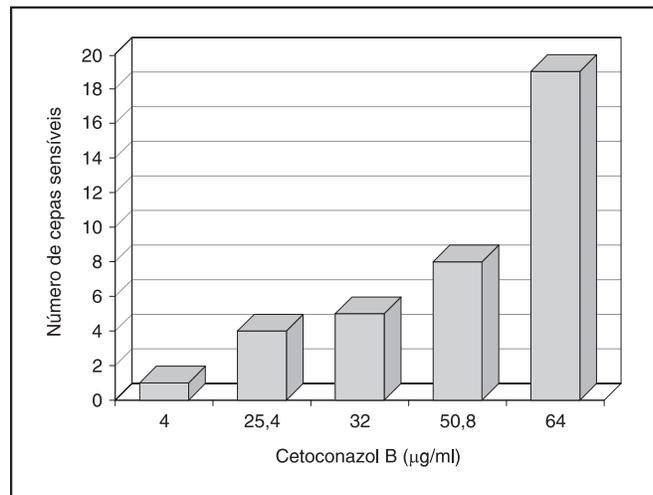
Os Gráficos de 1 a 6 exprimem a média geométrica dos resultados das CIMs e CFMs de anfotericina B, cetozonazol e miconazol frente as cepas estudadas. Os resultados obtidos nos testes de suscetibilidade, mostraram para anfotericina B, CIMs equivalentes a 0,03 µg/ml para a maioria dos isolados. Frente a três cepas, o poliênico apresentou CIMs de 0,04 µg/ml e para uma foi de 0,08 µg/ml (Gráfico 1). Quanto a CFM, valores de 0,12 µg/ml ou de 0,15 µg/ml foram obtidos para sete cepas, de 0,08 µg/ml ou de 0,05 µg/ml para duas e de 0,03 µg/ml para uma das cepas estudadas (Gráfico 2).

Quanto as CIMs do cetozonazol, a maioria das leveduras foi sensível à concentração de 4,00 µg/ml (17 cepas). Apenas uma foi inibida a 3,17 µg/ml, e outra o foi a 2,51 µg/ml (Gráfico 3). As CFMS do cetozonazol foram bastante variáveis, observando-se valor de 64,00 µg/ml frente a 11 cepas, de 50,80 µg/ml ou 25,40 µg/ml para três e de 32,00 µg/ml ou de 4,00/ml para uma única cepa (Gráfico 4).

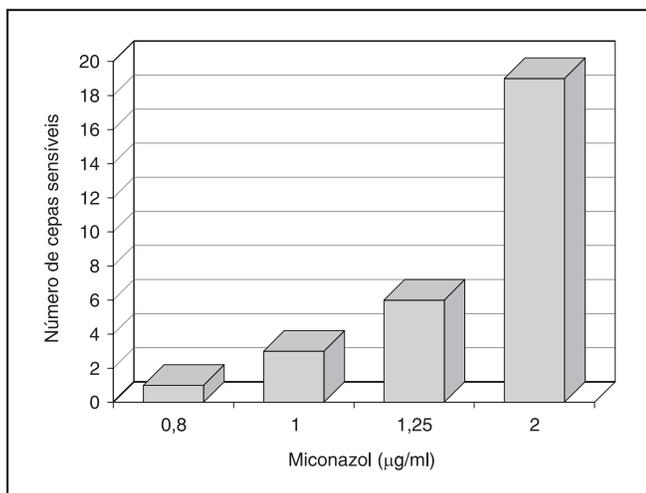
O miconazol foi ativo contra 13 leveduras em CIMs de 2,00 µg/ml; para três a CIM foi de 1,25 µg/ml ; para duas foi de 1,00 µg/ml e para



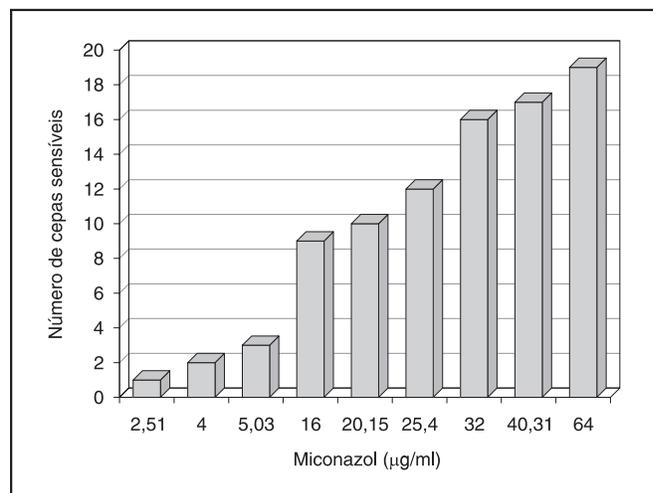
**GRÁFICO 3** - Número acumulado de cepas de *Candida albicans* sensíveis à CIM de cetozonazol isoladas de portadores de estomatite protética.



**GRÁFICO 4** - Número acumulado de cepas de *Candida albicans* sensíveis à CFM de cetozonazol isoladas de portadores de estomatite protética.



**GRÁFICO 5** - Número acumulado de cepas de *Candida albicans* sensíveis à CIM de miconazol isoladas de portadores de estomatite protética.



**GRÁFICO 6** - Número acumulado de cepas de *Candida albicans* sensíveis à CFM de miconazol isoladas de portadores de estomatite protética.

uma de 0,80 µg/ml (Gráfico 5). Também as CFMs desseazol mostraram amplas variações, de tal modo que a de 16 µg/ml foi letal para seis cepas; a 32,00 µg/ml o foi para quatro e a 64,00 µg/ml ou a 25,40 µg/ml para duas. Frente as cepas restantes, as CFMs foram respectivamente de 40,31 µg/ml; 20,15 µg/ml; 5,03 µg/ml; 4,00 µg/ml e de 2,51 µg/ml (Gráfico 6).

## DISCUSSÃO

Apesar da anfotericina B, ser um dos antifúngicos mais antigos e seu emprego restringir-se quase

que exclusivamente a administração sistêmica, ainda hoje, é considerada a droga de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas<sup>9</sup>. Assim, foi incluída neste trabalho como um parâmetro, considerando-se, também, sua excelente ação fungicida. As variáveis que atuam na mediação do mecanismo de resistência à anfotericina B, não estão ainda completamente elucidadas. Sabe-se que o sítio alvo principal da função antimicótica da anfotericina B é o ergosterol, componente da membrana celular da levedura<sup>3</sup>. Nos processos *in vivo*, no entanto, é importante lembrar que a ação da anfotericina B também provoca

alterações na membrana das células humanas ricas em colesterol, podendo provocar desequilíbrios na homeostase<sup>9,14</sup>.

Nossos resultados mostraram boa atividade fungistática da anfotericina B, equivalente a CIM de 0,03 µg/ml para a maioria das leveduras estudadas. Observou-se, também, excelentes resultados para ação fungicida (Gráfico 2) de tal modo que as CFMs variaram de 0,03 a 0,15 µg/ml para 15 das 19 cepas. É interessante lembrar que os níveis séricos alcançados pela anfotericina B no organismo humano são de cerca de 2,00 µg/ml, valor este muito superior aos da CFMs obtidas neste estudo<sup>7,9</sup>.

Com a descoberta dos azóis, um grande avanço foi dado à terapia antimicótica. Estes são considerados menos tóxicos que a anfotericina B, apresentam largo espectro de atividade e alguns deles podem ser ministrados por via oral para exercer ação sistêmica. Assim, encontram ampla aplicação em micologia médica<sup>3,9</sup>. Em nosso meio, ainda são bastante utilizados os imidazólicos de primeira e de segunda geração, como, respectivamente, o miconazol e cetoconazol. O miconazol, sob a forma injetável, tem uso restrito, devido à toxicidade que leva a reações colaterais em diversos graus; mesmo assim, encontram-se, na literatura, indicações para uso sistêmico desse azol<sup>2,18</sup>. Em situações clínicas especiais, sob a forma de creme, é muito utilizado em dermatologia, mas na clínica estomatológica, recomenda-se empregar o miconazol sob a forma de gel oral<sup>1,2</sup>. Nossa avaliação sobre a sensibilidade *in vitro* ao miconazol, confirmou ser esta substância fungistática, já que a maioria das cepas (13/19) foi sensível à concentração de 2,00 µg/ml. Com relação à CFM, os valores obtidos foram, no geral (16/19), muito elevados em relação aos 8,00 µg/ml alcançáveis no soro<sup>1,8,19</sup>.

O derivado azólico mais utilizado em nosso meio continua sendo o cetoconazol. Sua ação promove alterações na membrana da célula fúngica, mas pode ocasionar reações adversas no hospedeiro. Sua atividade, assim como a do miconazol, é predominantemente fungistática, embora possa agir em situações especiais como fungicida<sup>7,8, 11,13</sup>.

Nosso estudo, à semelhança do que pudemos constatar na literatura consultada, mostraram ser o cetoconazol uma droga com boa capacidade fungistática, visto que 17 das 19 cepas estudadas

foram sensíveis a 4,00 µg/ml. Neste contexto, deve-se considerar que os níveis séricos, alcançados pelos azóis, estão em torno de 8,00 µg/ml<sup>8,19</sup>. Com relação à CFM, o cetoconazol não mostrou boa atividade, pois cerca de 58% das cepas foram sensíveis a 64,00 µg/ml.

A solicitação clínica de cultura e antibiograma, em casos de estomatite protética, não é comum. Em geral, esta condição não traz comprometimento sistêmico ao paciente, mas apenas sintomatologia bucal. No entanto, a importância da realização destes testes reside no fato de que os mesmos podem oferecer referências para uma possível formulação tópica, tão desejada em nosso meio. O achado de uma substância ativa *in vitro*, capaz, ao menos, de reduzir o número de leveduras *in vivo*, torna-se desejável, principalmente em casos de imunodeficiência, onde uma candidíase bucal pré-instalada, pode levar a um quadro sistêmico mais grave<sup>2,8</sup>.

Este estudo permitiu considerar a necessidade de novas formulações para o tratamento da estomatite protética, uma vez que a ação local de algumas drogas de uso tópico tem-se mostrado benéfica. Deve-se considerar, porém, que existem diversos fatores, principalmente locais, associadas à essa entidade clínica e que a remoção destes é muito importante para a completa resolução do quadro presente.

## CONCLUSÕES

Frente às cepas de *Candida albicans*, isoladas de pacientes com a estomatite protética, pudemos demonstrar que a anfotericina B apresentou ótima atividade fungicida, em baixas concentrações (0,03 a 0,15 µg/ml), sendo a única droga do estudo com esta ação. Entre os azóis, o cetoconazol apresentou atividade fungistática (concentrações de até 4,00 µg/ml) para 100% das cepas; o miconazol também demonstrou atividade fungistática para as mesmas cepas, mas em concentrações inferiores do cetoconazol (de até 2,00 µg/ml); no entanto não apresentou atividade fungicida. Em vista do exposto, pode-se considerar que novas formulações das drogas atualmente disponíveis, ainda são necessárias para o tratamento da estomatite protética, assim como a pesquisa de novas drogas, principalmente para uso tópico.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Susceptibility to antifungal drugs of *Candida albicans* strains isolated from patients with denture stomatitis. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, out./dez. 1999.

Users of total prosthesis present in general a high frequency of the so called denture stomatitis, associated to erythematous candidiasis. So, we evaluated the susceptibility of oral yeast to three antifungal agents. Strains of *Candida albicans* isolated from patients with denture stomatitis were evaluated in relation to the susceptibility of the antifungal drugs as amphotericin B (polyenic derivatives), and azole agents as ketoconazole and miconazole. The antifungal activity was evaluated, and the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicide concentration (MFC) were determined utilizing the agar dilution method. The results demonstrated low values for MICs and MFCs (0.15 µg/ml) for AmB in face of all yeast present. For miconazole and ketoconazole, MICs were invariably ≤ 4.00 µg/ml, while values of the MFC were ≥ 16.00 µg/ml for the majority of the strains. We could conclude that AmB presented a major fungicidal action *in vitro*, while azoles demonstrated a fungistatic but not fungicidal profile. So, we can consider that new drugs, mainly topical ones, are needed to treat lesions related to denture stomatitis, so commonly observed in wearers of dental prostheses.

UNITERMS: Candidiasis, oral; Stomatitis, denture; Fungi; Antifungal agents; Amphotericin B; Azoles.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BODEY, G. P. Azole antifungal agents. **Clin Infect. Dis.**, v. 19, Suppl.1, p. S161-S169, 1992.
2. BOELAERT, J.; DANEELS, R.; VAN LANDRUYT; SYMOENS, J. Miconazole plasma levels in healthy subjects and in patients with impaired renal function. **Chemotherapy**, v. 6, p. 165-169, 1976.
3. BRAJTBURG, J.; POWDERLY, W. G.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Amphotericin B: delivery systems. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 2, p. 381-384, Feb. 1990.
4. BUDTZ-JØRGENSEN, E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res**, v. 82: p. 151-190, 1974.
5. BUDTZ-JØRGENSEN, E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. **J Oral Pathol Med**, v. 10, n. 2, p. 65-80, 1981.
6. CUMMING, C. G.; WIGHT, C.; BLACKWELL, C. L.; WRAY, W. Denture stomatitis in the elderly. **Oral Microbiol Immunol**, v. 5, n. 2, p. 82-85, Apr. 1990.
7. DANESHMEND, T. K., WARNOCK, D. W. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. **Clin Pharmacokinet**, v. 8, p. 17-42, 1983.
8. EPSTEIN, J. B. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 69, p. 32-41, Jan. 1990.
9. HOEPRICH, P. D. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique and fact. **Clin Infect Dis.**, v. 14, Suppl. 1, p. S114-S119, 1992.
10. HOLMSTRUP, P.; AXELL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, v. 48, p. 57-59, Feb. 1990.
11. LEWIS, M. A. O.; SAMARANAYAKE, P.; LAMEY, P. J. Diagnosis and treatment of oral candidosis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 49, n. 9, p. 996-1002, 1991.
12. MIKKONEN, M.; NYSSONEN, V.; PAUNIO, I.; RAJALA, M. Prevalence of oral mucosal lesions associated with wearing removable dentures in Finnish adults. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 12, p. 191-194, 1984.
13. MUZYKA, B. C.; GLICK, M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. **J Am Dent Assoc**, v. 126, n. 1, p. 63-72, Jan. 1995.
14. NEIBART, E.; GUMPRECHT, J. Antifungal agents and the treatment of fungal infections of the head and neck. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 26, n. 6, p. 1123-1132, Dec. 1993.
15. ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. London : Bailliere Tynhall, 1988. 468 p.
16. SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. **Oral Candidosis**. London : Butterworth, 1990. 265 p.
17. SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility test and bioassay In: LENNETTE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLERS JR. V.; SHADOMY, H. J. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington : American Society of Microbiology, 1985. p. 991-999.
18. STEVENS, D. A. Antifungal drug susceptibility testing. **Mycopathologia**, v. 87, p. 135-440, 1984.
19. VANDEN BOSSCHE, H.; WARNOCK, D. W., DUPONT, B., KERRIDGE, D. SEN GUPTA, S., IMPROVISI, L., MARICHAL, P., ODDS, F. C., PROVOST, F., RONIN, O. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **J Med Vet Mycol**, v. 32, Suppl.1, p. 189-202, 1994.

Recebido para publicação em 24/06/99

Aceito para publicação em 11/11/99