AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E SINERGISMO DA QUITOSANA COM ANTISSÉPTICOS À BASE DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO.

Miguel Guaresi Dolemba (PIBIC/FA/UEM), Lucas Guilherme Toshio Takeuti Wada, Núbia Inocêncya Pavesi Pini, Sheila Alexandra Belini Nishiyama (Orientadora). E-mail: sabnishiyama@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Microbiologia/Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: S*treptococcus mutans*; *Candida albicans*; Índice de concentração inibitória fracionada (FICI).

RESUMO

A cavidade bucal apresenta uma microbiota diversificada cujo equilíbrio é essencial para a manutenção da saúde. A formação de biofilmes pode dificultar o controle microbiano, tornando os antissépticos importantes como agentes adjuvantes à remoção mecânica. Nesse contexto, a quitosana tem apresentado potencial antimicrobiano e a possível associação com outros agentes, despertando interesse para sua aplicação em produtos de higiene bucal. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da quitosana, isolada e associada ao peróxido de hidrogênio (Blue®M) e ao cloreto de cetilpiridínio (Colgate Plax®), frente a S*treptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (MIC) pelo método de macrodiluição em caldo e as interações entre os agentes pelo método *Checkerboard* modificado, com cálculo do índice da fração da concentração inibitória (FICI). As combinações Colgate Plax®+quitosana apresentaram FICI próximo de 2,0 para as duas espécies analisadas e para Blue®M+quitosana o FICI foi ≥4. Conclui-se que a associação da quitosana ao Colgate Plax® não resultou em efeito sinérgico, enquanto sua combinação com o Blue®M mostrou-se antagônica. Esses resultados reforçam a necessidade de cautela ao combinar quitosana a antissépticos comerciais e apontam para a importância de novos estudos sobre diferentes concentrações e características físico-químicas da quitosana, a fim de esclarecer seu real potencial como agente adjuvante em enxaguatórios bucais.

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal apresenta uma microbiota diversificada, cujo equilíbrio é essencial para a saúde. Alterações nessa comunidade podem favorecer a disbiose e o desenvolvimento de doenças, enquanto a organização dos microrganismos em biofilmes dificulta seu controle. Embora a remoção mecânica seja fundamental para o controle microbiano, os antissépticos bucais podem atuar como agentes

adjuvantes. A clorexidina apresenta elevada eficácia antimicrobiana, porém seu uso prolongado está associado a efeitos adversos e alterações no equilíbrio microbiano. Alternativamente, o peróxido de hidrogênio e o cloreto de cetilpiridínio apresentam menor atividade antimicrobiana, mas podem ser utilizados por períodos mais prolongados. Nesse contexto, a quitosana apresenta potencial para associação com esses agentes, podendo contribuir para sua ação antimicrobiana (FARIAS *et al.,* 2019). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano da quitosana e seu possível efeito sinérgico quando associada a antissépticos bucais à base de peróxido de hidrogênio e cloreto de cetilpiridínio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo do inóculo microbiano e da solução de quitosana

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Candida albicans* ATCC 10231, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Estadual de Maringá e armazenadas a –20 °C. Após descongelamento e reativação, as cepas foram submetidas a dois repiques em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Becton Dickinson & Co., Sparks, EUA), com incubação a 37 °C por 48 horas, em microaerofilia para *S. mutans* e aerobiose para *C. albicans*. Posteriormente, foram semeadas em ágar BHI e, na sequência, 4 a 5 colônias foram transferidas para 5 mL de caldo BHI. As suspensões foram ajustadas a 0,5 na escala de McFarland, correspondente a aproximadamente 1,5 × 10^8 UFC/mL. A solução de quitosana (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi preparada conforme PINI *et al.* (2020) utilizando 1,0 g de quitosana, 0,5 mL de ácido acético e água destilada para preparar 50 mL da solução, sendo homogeneizada e mantida em repouso à temperatura ambiente por 24 horas antes da utilização.

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) das associações pelo método Checkerboard modificado

As MICs da quitosana, do cloreto de cetilpiridínio (Colgate Plax®) e do peróxido de hidrogênio (Blue®M) foram determinadas pelo método de macrodiluição, utilizando caldo BHI para *S. mutans* e caldo RPMI 1640 para *C. albicans*, conforme CLSI M07-A12 (2024). Já a atividade antimicrobiana das associações foi avaliada pelo método *Checkerboard* modificado, em duplicata, conforme metodologia adaptada de ELIOPOULOS e MOELLERING (1991). Foram avaliadas as combinações entre quitosana e o Colgate Plax® e Blue®M. As soluções foram homogeneizadas e submetidas às mesmas condições de determinação das MICs. A interação foi avaliada por meio do índice de concentração inibitória fracionada (FICI), calculado por:

$$FICI = \frac{\text{MIC antimicrobiano A combinado}}{\text{MIC antimicrobiano A puro}} + \frac{\text{MIC antimicrobiano B combinado}}{\text{MIC antimicrobiano B puro}}$$

Os resultados foram classificados como sinérgicos quando FICI ≤ 0,5, indiferentes quando 0,5 < FICI ≤ 4 e antagônicos quando FICI > 4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As MICs frente à *S. mutans* e *C. albicans* foram determinadas isoladamente. Após isso foram realizados os testes de associação por *Checkerboard* modificado, com as combinações dos antissépticos com quitosana, conforme é possível observar na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos antissépticos bucais isoladamente e em associação com a quitosana.

Produtos	Microrganismos MICs	
	S. mutans	*C. albicans*
Colgate Plax®	≤ 1/256	≤ 1/256
Blue®M	≤ 1/256	≤ 1/256
Quitosana	≥1/2	1/2
Colgate Plax®+ Quitosana	≤ 1/256	1/128
Blue®M+ Quitosana	1/2	≥1/2

A partir desses dados, foi possível determinar a FICI, conforme a Tabela 2. Dessa forma, considerando os parâmetros metodológicos, os resultados caracterizam uma associação indiferente para Colgate Plax®+quitosana e antagonismo para Blue®M+quitosana, frente às duas espécies.

Tabela 2. Interpretação dos resultados da FICI para as combinações de Colgate Plax®+quitosana e Blue®M+quitosana

Combinação	Microrganismo	FICI	Interpretação
Colgate Plax® + quitosana	*S. mutans*	0,5 < FICI ≤ 4	Indiferente
	C. albicans	0,5 < FICI ≤ 4	Indiferente
Blue®M + quitosana	*S. mutans*	> 4	Antagonismo
	C. albicans	> 4	Antagonismo

Embora alguns autores tenham demonstrado efeitos superiores ou semelhantes de formulações com quitosana na redução de biofilme, gengivite e no combate à *C. albicans* (PANDIYAN *et al*., 2022), nossos resultados evidenciaram que a adição da quitosana às formulações do estudo não incrementou a eficácia antimicrobiana dos produtos frente tanto a *S. mutans* como *C. albicans*. Todavia, o estudo de VIEIRA (2006) corrobora com nossos resultados, pois os dados demonstraram que a quitosana não apresenta efeito antimicrobiano superior ao controle.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a associação da quitosana ao Colgate Plax® não resultou em efeito sinérgico, enquanto sua combinação com o Blue®M mostrou-se antagônica. Esses resultados reforçam a necessidade de cautela ao combinar quitosana a antissépticos comerciais e apontam para a importância de novos estudos sobre diferentes concentrações e características físico-químicas da quitosana, a fim de esclarecer seu real potencial como agente adjuvante em enxaguatórios bucais.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos aos professores, técnicos e alunos do Laboratório de Microbiologia Básica e à Fundação Araucária pela bolsa concedida para execução desse projeto.

REFERÊNCIAS

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 12th ed. CLSI document M7-A12. Wayne, PA: CLSI, 2024.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. (ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. 3rd ed. Baltimore: Wilkins Co., 1991. p. 432–492

FARIAS, J. M. *et al.* Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 853–860, maio 2019.

PANDIYAN, I. *et al.* Efficacy of Chitosan and Chlorhexidine Mouthwash on Dental Plaque and Gingival Inflammation: A Systematic Review. **Cureus**, 19 mar. 2022.

PINI, N. I. P. *et al.* Viscosity of chitosan impacts the efficacy of F/Sn containing toothpastes against erosive/abrasive wear in enamel. **Journal of Dentistry**, v. 92, p. 103247, 1 jan. 2020.

VIEIRA, Liza Barreto. Eficácia do bochecho de quitosana a 0,4% sobre o biofilme e bactérias orais. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Preventiva e Social; Periodontia e Prótese Dentária) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.