AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DA SALIVA ARTIFICIAL CONTENDO LISOZIMA, LACTOFERRINA E LACTOPEROXIDASE FRENTE A ESCHERECHIA COLI e STAPHILOCOCCUS AUREUS

Naiara Lagos Soares (PIBIC/FA),Tainara Aparecida Julinhaque, Eduardo Bauml Campagnoli (orientador), e-mail: ebcampagnoli@yahoo.com.br.
Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento de Odontologia

Ciências da Saúde, Odontologia

Palavras-chave: hipossalivação, saliva, enzimas.

Resumo

O objetivo desse estudo, foi avaliar a capacidade antimicrobiana e a formação de biofilme na presença da saliva artificial contendo enzimas (BioXtra®) em relação a saliva artificial sem enzimas. Para tanto, foram realizados testes em microplacas de poliestireno contendo 96 poços e Teste de Difusão em Ágar, frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherechia coli* . Os resultados para o Teste de Difusão em Ágar, foram respectivamente, entre a Saliva Artificial com e sem Enzima, (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,0450). Para o teste de microtitulação os resultados foram os seguintes, saliva artificial com e sem enzimas frente a *Staphylococcus aureus*, sobre o biofilme já formado (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,2159) e (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,3052) inibindo a formação do biofilme. E frente a *Streptococcus mitis* sobre o biofilme já formado (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,0370) e (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,7237) inibindo a formação do biofilme. Não houve diferença estatisticamente significante na ação antimicrobiana e na capacidade de inibir a formação do biofilme quando comparou-se a saliva artificial com e sem enzimas.

Introdução

A saliva que é um biofluído, e na sua composição química, encontra-se água, mucina, sais orgânicos e enzimas, dentre elas ptialina, lactoferrina, lisozima e peroxidase (MOSLEMI 2015).

No entanto, muitos pacientes apresentam o quadro de hipossalivação, ou seja, diminuição efetiva do fluxo salivar (FREITAS et al., 2010). A hipossalivação leva a complicações bucais como dor, gengivite, halitose, cárie dentária. Além disso, torna o meio mais vulnerável a infecções como é o exemplo da Candidose, mucosite, Quelite Angular, Faringite e Laringite (SILVA et al., 2016 ; FALCÃO et al ., 2013; SAMNIENG et al., 2012; ALMEIDA et al., 2010; GIAFFERS et al., 2017)

Nesses casos torna-se imperativo a adoção de métodos paliativos, como é o caso da utilização de substitutos de saliva (ESIN et al., 2008). Existem salivas artificiais no mercado como e o caso da BioXtra® que para conferir capacidade antimicrobiana são incorporadas a elas enzimas como lactoferrinas, lisozimas e lactoperoxidases. Estas três enzimas antimicrobianas apresentam um efeito aditivo no combate às bactérias (TENOVOU, 2002). Portanto o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano e a capacidade de inibir a formação de biofilme da saliva artificial com enzimas (BioXtra®) , comparando-a com a saliva artificial sem enzimas, frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherechia coli***.**

Material e Métodos

Este estudo foi usado o meio de cultura de Infusão Cérebro Coração (BHI) e as cepas comerciais de *Escherechia coli* (ATCC:903) e *Stafilococcus aureus* (ATCC:25923).

Foram realizadas suspenções bacterianas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland. Além disso, utilizou-se a saliva artificial com enzimas BioXtra® em gel, saliva artificial sem enzimas em gel, clorexidina em gel 0,12% e salina estéril.

Teste de difusão em ágar

Esse teste avaliou a ação bactericida da saliva(BioXtra®) . Para tanto, foi mergulhado um *swab* de algodão na suspensão bacteriana padronizada e espalhou-se pela técnica das 8 direções. Em seguida, com auxílio de ponteiras estéreis, foram confeccionados 4 poços no ágar e as cavidades preenchidas com 120µl de saliva artificial com enzimas (BioXtra®) ou saliva artificial comum ou clorexidina 0,12% ou solução salina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC, por 48 horas e na sequência os halos de inibição foram mensurados. O experimento foi realizado em pentaplicata.

Teste em placas de 96 poços

Nesse experimento analisou-se a ação das salivas artificiais com e sem enzimas sobre a formação do biofilme. Para tanto, foram utilizadas 2 microplacas de poliestireno. Cada poço recebeu 150µl do meio de cultura Caldo BHI, 20µl da suspensão bacteriana previamente padronizados e 30µl de saliva artificial com enzimas (BioXtra®) ou saliva artificial comum ou salina estéril. .A microplaca foi incubada em estufa bacteriológica por 48 horas a 37ºC Depois, o conteúdo dos poços foi lavado com solução salina. Logo após, foi realizada a fixação com metanol p.a. e foram deixadas para secar e coradas com solução de cristal violeta. Em seguida, as placas foram lavadas com água e secas. Após este processo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 570nm. Os dados obtidos foram analisados por software estatístico (BioEstat 5.0; Brasil) e optou-se por utilizar métodos não-paramétricos, com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Teste de difusão em ágar

O método de difusão em ágar se baseia na difusão radial das substâncias. Esse método é mais adequado para testar a difusão de substâncias em extratos etanólicos e proporciona maior facilidade de contato entre os produtos testados e os microrganismos (ALVES et al., 2008).

Os dados revelaram que no grupo da Clorexidina, os halos de inibição foram maiores porém houve formação de pequenos halos ao se utilizar a Saliva Artificial com Enzimas, sendo que não constatou-se diferença estatisticamente significante

entre esses grupos, isso pode ser decorrente de a amostra contar somente com a medida de 5 halos (*n* amostral pequeno), conforme mostram as Tabelas 01 e 02.

Tabela 1 – Teste de difusão em ágar frente a *Staphylococcus aureus*, medida dos halos de inibição formados (milímetros)

	Salina	Clorexidina	Saliva Artificial	Saliva Artificial com Enzimas
Média aritmética (DP)	0 (0)[a,]	12,6 (3,51)[b]	0 (0)[a]	2,6 (1.34)[b]
Mediana	0	11	0	2
Mínimo	0	9	0	2
Máximo	0	18	0	5

Nota: Letras iguais indicam que não houve diferença estatística quando comparado a solução salina (controle negativo).

Tabela 2 – Teste de difusão em ágar frente a *Escherechia coli* , medida dos halos de inibição formados (milímetros)

	Salina	Clorexidina	Saliva Artificial	Saliva Artificial com Enzimas
Média aritmética (DP)	0 (0)[a,]	13,6 (2,70)[b]	0 (0)[a]	5 (2,74)[b]
Mediana	0	13	0	7
Mínimo	0	11	0	2
Máximo	0	18	0	7

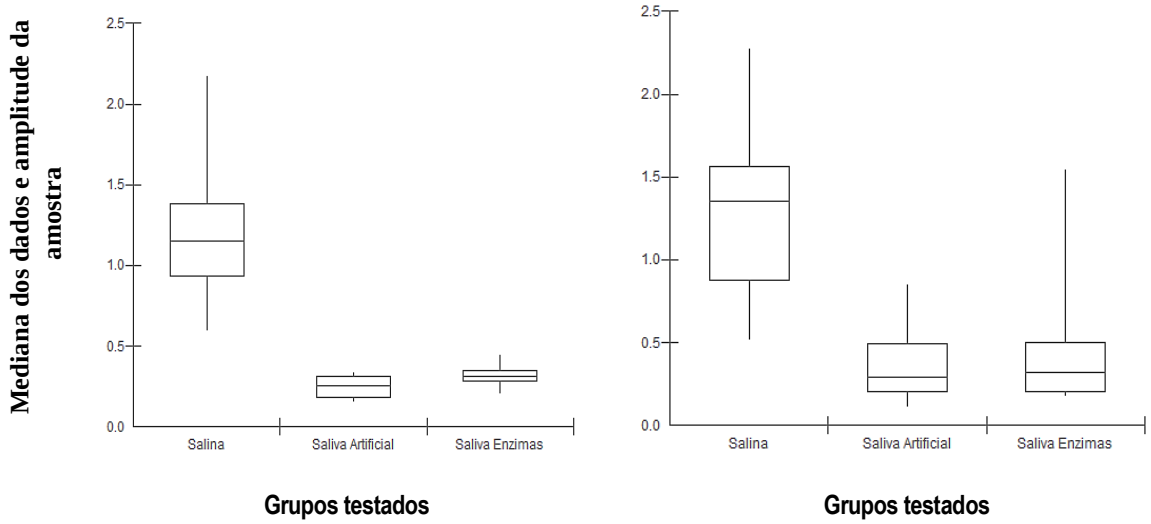
Nota: Letras iguais indicam que não houve diferença estatística quando comparado a solução salina (controle negativo).

Teste em placas de 96 poços

O uso de saliva artificial com ou sem enzimas foram eficazes na inibição de formação do biofilme quando comparado com a solução salina, para ambas as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus* e *Escherechia coli),* conforme Gráfico 01. Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre as Salivas Artificiais com ou sem enzima tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherechia coli.*

Grafico 01: Ação das diferentes salivas artificiais testadas sobre a inibição de formação do biofilme *Staphylococcus aureus e Escherechia coli.*

Staphylococcus aureus. ***Escherechia coli*.**



Conclusão/ões

Com base nos métodos experimentais empregados pode-se concluir que não houve diferença na ação antimicrobiana e na sua ação sobre o biofilme da saliva artificial com enzimas (Lactoferrina, Lisozima e Peroxidase) comparado a saliva artificial sem enzimas.

Agradecimentos

Prof. Dr.Eduardo Bauml Campagnoli, Prof. Dr. Luis Antônio Esmerino, a técnica Maria Janaína Diniz. Também agradocço ao Órgão de Fomento em Pesquisa Fundação Araucária e a UEPG

Referências

ALMEIDA, P.J.; KOWALSKIK, L.P. **Pilocarpine use to treat xerostomia in patients submitted to radioactive iodine therapy: a pilot study**. Braz J Otorhinolaryngol. 2010.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; Casemiro, L.A.; et al. **Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras**. Química Nova, Franca, 2008.

ESIN, A.; et al. **The efficacy of Xialine in patients with Sjogren's Syndrome: a single-blind, cross-over study**. Clin. Oral Invest. 2008.

FREITAS, D.A.; CABALLERO, A.D.; PEREIRA, M.M.; OLIVEIRA, S.K.M.; SILVA, G.P.; HERNÁNDEZ, C.I. **Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço**. Rev. 2R1. Montes Claros. 2010.

GIAFFERS, R.B.L.; JUNIOR, L.A.V.S.; SANTOS, P.S.S.S.; CHICALA, G.M. **Estratégias Terapêuticas disponíveis para xerostomia e hipossalivação em pacientes irradiados de cabeça e pescoço: Manual para profissionais da saúde**. Rev. Uningá. 2017.

MOSLEMI, M.; SATTARI, M.; KOOSHKI, F.; FOTUHI, F.; Modarresi, N.; Khalili, Sadrabad, Z.; et al. **Relationship of Salivary Lactoferrin and Lysozyme Concentrations with Early Childhood Caries**. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2015.