AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICÁCIA DA SALIVA ARTIFICIAL CONTENDO LISOZIMA, LACTOFERRINA E LACTOPEROXIDASE FRENTE A LEVEDURAS CANDIDA SPP.

Tainara Aparecida Julinhaque (BIC/ UEPG), Naiara Lagos Soares (co-autor)
Eduardo Bauml Campagnoli (orientador), e-mail: ebcampagnoli@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia

Ciências da Saúde - Clínica Odontológica

Palavras-chave: Saliva artificial, *Candida* spp, hipossalivação.

Resumo

Essa pesquisa buscou avaliar o efeito antifúngico e antiaderente da saliva artificial (BioXtra®) em gel contendo enzimas, contra *Candida albicans,*. O primeiro teste foi da difusão em Agar poço, sobre a *Candida albicans* em toda placa, nos poços foi adicionado meio de cultura, as substâncias testadas (saliva artificial (BioXtra®, saliva artificial sem enzimas, clorexidina 0,12% e salina). O segundo teste foi realizado sobre microplacas de poliestileno, onde foi acrescentado meio de cultura, o microrganismo e as substâncias testadas (salina, saliva BioXtra®, saliva artificial sem enzimas) . As placas foram incubadas em estufa 37ºC, após 48 horas foi feita a medida dos halos e após 72 horas foi realizada a leitura do comprimento de onda de 570nm em leitor de ELISA, nos respectivos testes. No primeiro teste a clorexidina apresentou maior halo de inibição (p=0,0029) em relação a saliva com enzimas e sem enzimas, porém essas, não apresentaram diferença estatística entre elas (p=0,1030). No segundo experimento as salivas com e sem enzimas apresentaram efeito antifúngico, mas estatisticamente não pode-se observar diferença (p=0,4087). Concluindo que na presente metodologia, a saliva artificial com enzimas (BioXtra®), não possui efeito antifúngico, apresentando resultados parecidos com a saliva sem enzimas.

Introdução

A saliva tem atividade antimicrobiana e tamponante, além de auxiliar no processo de remineralização da estrutura dentária CABRAL (2012). Na saliva há enzimas como: Lisozima, Peroxidase e Lactoferrina; as quais são importantes na resposta imune inata contra bactérias, fungos e vírus TENOVUO J., 2002).

Pacientes que possuem baixa ou nenhuma produção de saliva (hipossalivação) perdem essa importante linha de defesa do corpo contra microrganismos, facilitando o desenvolvimento de infecções oportunistas (GOMES, 2012). O quadro de hipossalivação pode ser desencadeado pelo uso de determinados medicamentos (anti-hipertensivos, antidepressivos, ansiolíticos); pelo tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço (cujo feixe de radiação atingiu as glândulas salivares); por doenças que afetam as glândulas salivares (Síndrome de Sjögren) e doenças sistêmicas que comprometem a secreção salivar (*Diabetes mellitus*) (MOREIRA, 2016; FREITAS *et al* 2011)

Esse estudo teve por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano e a capacidade de inibir a formação de biofilme *in vitro,* com o uso da saliva artificial em gel com enzimas (Lisozima, Lactoferrina e Lactoperoxidase) (BioXtra@), comparando-a com a saliva artificial sem enzimas, frente a *Candida albicans*.

Material e Métodos

Foram utilizadas as cepas comerciais de *Candida albicans* (levedura). Essa levedura foi cultivada em placas de Petri (20x100mm) contendo Agar Sabouraud por 24 horas em estufa bacteriológica a 37ºC.

Na sequência, foi feita uma suspensão equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Dessa suspensão, foi utilizado 100µl e inoculados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud (cultivo de fungos) pela técnica das oito direções. Logo em seguida, foram feitos quatro poços com ponteiras de plástico, utilizadas em micropipetas. Em seguida foram inoculados a saliva artificial contendo enzimas (BioXtra®), saliva artificial padrão (sem enzimas), solução de Clorexidina 2% e solução salina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 37ºC por 48 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição foram medidos utilizando régua milimetrada. Depois, o conteúdo dos poços foi aspirado e cada poço foi lavado por três vezes com 250µl de solução salina estéril. Logo após, foi realizada a fixação com 200µL de metanol p.a. (pureza absoluta) por 15 minutos. O metanol foi removido; as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secar e coradas com 200µL de solução de cristal violeta por cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente. Após este processo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 570nm.

Todos os experimentos foram realizados em pentaplicata.

Os dados obtidos foram tabulados em planilha do Microsoft Excel e analisados por software estatístico (BioEstat 5.0; Brasil), considerando o nível de significância de 5%. Optou-se por utilizar métodos não-paramétricos na análise estatística.

Resultados e Discussão

No presente trabalho a Clorexidina apresentou um maior halo de inibição e diferindo estatisticamente dos demais grupos (Kruskall-Wallis, p=0,0029), conforme pode ser observado na tabela 01. No entanto, a saliva artificial sem e com enzimas, não exibiram diferença estatisticamente significante (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,1030) entre elas.

Tabela 01: Teste de difusão em águar – Medida dos halos de inibição formados (milímetros)

	Salina	Clorexidina	Saliva Artificial sem enzimas	Saliva Artificial com Enzimas
Média aritmética (DP)	0 (0)[a]	12,6 (2,18)[b]	0 (0)[a]	2,0 (1.87)[a]
Mediana	0	13	0	2
Mínimo	0	5	0	0
Máximo	0	19	0	5

O poder antifúngico da clorexidina 2% contra *Candida albicans*, já foi comprovado por vários estudos (Cruz VM. *et al,* 2017). Como nesse estudo, Güneri *et al* (2011) não encontraram efeito antifúngico da saliva artificial contendo enzimas (BioXtra®).

Com relação ao efeito na formação do biofilme na superfície das placas (pocinhos) O uso de saliva artificial com ou sem enzimas foram eficazes na inibição de formação do biofilme quando comparado com a solução salina (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,0428 e p=0,0044, respectivamente). Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre as Salivas Artificiais com ou sem enzima (Teste de Student-Newman-Keul, p=0,4087), conforme apresentado no gráfico 01.

ISSN 1676-0093

Gráfico 1: representação gráfica do resultado do teste da inibição do biofilme

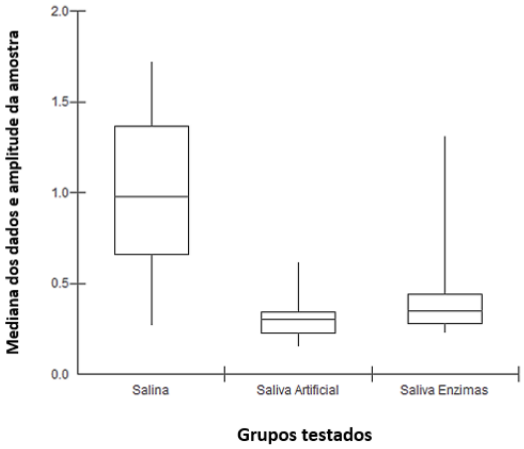


Gráfico1: A salina apresentou maior absorbância se comparada as salivas artificiais com ou sem enzimas. As salivas apresentaram menor absorbância, ou seja apresentaram efeito antifungico, mas se comparadas, a saliva artificial com enzimas não diferiu tanto em valor.

Teste para verificar a inibição na formação de biofilme, foram realizados por Hatti *et al* (2007) tendo como base dentifrício contendo as mesmas enzimas e ao contrário desse estudo, concluiu-se que o dentifrício com enzimas inibe a formação de biofilme, além de apresentar propriedades antimicrobianas quando comparada com um dentifrício sem enzimas.

Sendo assim,o custo x benefício (valor e efeito das salivas sobre *Candida albicans*), da saliva artificial com enzimas não é tão vantajoso em relação a saliva artificial sem enzimas. No entanto, mais pesquisas deverão ser realizadas para melhor compreender a ação dessas enzimas quando apresentadas juntamente na saliva artificial.

Conclusão/ões

Conclui-se, com a metodologia utilizada no presente estudo, que não houve efeito antifúngico estatisticamente efetivo da saliva com enzimas BioXtra® em comparação a saliva artificial sem enzimas, sobre a *Candida albicans.*

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária e UEPG pela oportunidade de realizar a pesquisa, bem como colaborar com meu crescimento acadêmico. Ao Laboratório de Microbiologia do SEBISA/UEPG e aos funcionários que ali trabalham. Também a colega Naiara Lagos Soares, por ter participado e me ajudado na realização dos experimentos. E ao meu orientador Prof. Eduardo Bauml Campagnolli, que sempre sanou minhas dúvidas, e esteve sempre disposto a me ajudar quando precisei, proporcionando o desenvolvimento do presente trabalho.

Referências

1. MOREIRA, A. S. S. **Complicações orais da radioterapia e quimioterapia – implicações na qualidade de vida**. Monografia de revisão bibliográfica mestrado integrado em medicina dentária. Porto, 2016.
2. CABRAL, S. **Saliva natural *versus* saliva artificial: composição bioquímica.** Monografia de investigação ou relatório de atividade clínica. Porto, 2009.

3. FREITAS, D. A..; CABALLERO, A. D; PEREIRA, M. M. **Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço**. [s. n.]. São Paulo. 2011
4. CRUZ, V. M.; FORCIN, L. V.; WECKWERTH, V. V. B. *et al*. **Atividade antifúngica in vitro de pastas de hidróxido de cálcio associado com fármacos sobre Candida albicans**. Brazilian Oral Research [S.l: s.n.] 2011
5. GÜNERI, P. *et al.* **Efeitos antimicrobianos in vitro de agentes umidificantes para a boca disponíveis no mercado**. Dentista Especialista. V.31, n.4, p.123-128, Jul-ago de 2011
6. HATTI, S. *et al*. **Inibição de biofilme e atividade antimicrobiana de um dentifrício contendo substitutos salivare**s. Int J Dent Hyg , v. 5, n.4, p 218–224. Novembro de 2007.
7. GOMES, S. F. **Atuação do cirurgião-dentista na uti: um novo paradigma**. Rev. bras. odontol. Rio de Janeiro. v. 69, n. 1, p. 67-70, jan./jun. 2012

ISSN 1676-0093