

BIOFILME POR *Candida albicans* EM SUPERFÍCIES RESINOSAS DE PRÓTESES DENTÁRIAS TRATADAS COM EXTRATOS VEGETAIS

CRUZEIRO, Maria Elvira Sica¹, D'AVILA, Camila Amaral^{2*}; ALVES, Gabriela Hörnke³; CLEFF, Marlete Brum⁴; PINTO, Luciana Rezende⁵; MEIRELES, Mário Carlos Araújo⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel. ²Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel; ³Mestranda em Bioquímica e Bioprospecção – UFPel ⁴ Professor Adjunto Depto. Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel; ⁵Professor Adjunto Depto. Prótese Total, Faculdade de Odontologia, UFPel. ⁶Professor Associado Depto. Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel *camila.amaral.davila@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O principal agente formador do biofilme é *Candida albicans*, levedura oportunista, saprófita, que na dependência de fatores predisponentes torna-se patogênica. Os biofilmes são estruturas biológicas com um elevado grau de organização, onde os microorganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície úmida, seja ela biótica ou abiótica, por exemplo em condutas de água, na pele e mucosas, nos dentes, em próteses e nas indústrias (RAMOS et al., 1999).

Em contraste à vasta descrição dos biofilmes bacterianos, pouca atenção era dada aos biofilmes formados exclusivamente por fungos. Porém, devido às respostas inflamatórias que podem ocorrer nas mucosas bucais, decorrente do contato com as próteses, essa estrutura complexa tornou-se alvo de interesse de diversos estudos (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Para o tratamento ou eliminação do biofilme, vários antifúngicos têm sido utilizados, assim como os desinfetantes (FERREIRA et al., 2009). Entretanto, tem havido uma busca por produtos de origem vegetal, devido a grande diversidade de cobertura vegetal existente no Brasil. Neste sentido, as plantas condimentares têm sido alvo de estudos, devido à quantidade de compostos fenólicos, destacando-se *Rosmarinus officinalis* ou alecrim, sendo que, os principais componentes do óleo essencial do alecrim são pinenos, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora e diterpenos. Os extratos da planta demonstram propriedades antissépticas para as vias aéreas e cavidade bucal, ação antidepressiva, calmante e cicatrizante, entre outros (LORENZI; MATOS, 2002).

Assim, objetivou-se com este trabalho quantificar a formação do biofilme por *Candida albicans* em superfícies de resinas acrílicas usadas na confecção de próteses dentárias, tratadas ou não com extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis*.

2 METODOLOGIA

O alecrim (*R. officinalis*) utilizado no estudo, foi obtido de distribuidor comercial com certificado de qualidade. Após, o alecrim foi encaminhado ao Centro de Ciências Químicas e Farmacêuticas para extração do óleo essencial e preparação do extrato hidroalcoólico.

Para a obtenção do óleo essencial de alecrim utilizou-se 100g do produto que foi submetido à hidrodestilação em Clevenger, após foi armazenado sob refrigeração

(Farmacopéia Brasileira IV). Para os extratos hidroalcoólicos utilizou-se 20g de folhas secas de alecrim com 200mL de solução etanólica a 80%, por 1 hora à 40°C controlada por banho de óleo, sendo então filtrado e repetido por duas vezes juntando-se os filtrados. Em seguida, o etanol foi retirado por rotaevaporador, obtendo-se o extrato.

Para o biofilme foram utilizadas colônias de *Candida albicans* provenientes do Centro Integrado de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP. Os corpos de prova foram confeccionados em resina acrílica, polidos e colocados em água estéril por 72h para liberação dos monômeros da superfície e esterilizados com óxido de etileno (WANDER et al., 2008). Para o desenvolvimento do trabalho os corpos de prova foram divididos em grupos - **G1**: Corpos de prova sem tratamento e não inoculados; **G2**: Corpos de prova sem tratamento e inoculados; **G3**: Corpos de prova com Nistatina; **G4**: Corpo de prova com loção a 24% do óleo essencial de *R. officinallis*; **G5**: Corpo de prova com óleo essencial em carbopol; **G6**: Corpo de prova extrato hidroalcoólico de *R. officinallis*; **G7**: Corpo de prova com carbopol.

Após tratados com diferentes extratos de *R. officinallis* e grupos controle, os corpos de prova foram inoculados com 1×10^7 cél/mL de *C. albicans* e incubados à 37°C à 75 rpm, por um período de 48h para formação de biofilme. Posteriormente, os corpos de prova foram submetidos à coloração por cristal violeta para a realização do ensaio de quantificação do biofilme em espectrofotômetro com comprimento de onda 570.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após um período de imersão de duas semanas nos diferentes tratamentos, a formação do biofilme de *C. albicans* no material de prótese foi avaliada por meio de espectrofotômetro, demonstrando diferenças entre os tratamentos (Tab.1)

Tabela 1- Leitura espectrométrica do biofilme por *Candida albicans*, de acordo com os diferentes grupos de tratamento

TRATAMENTOS	LEITURA ESPECTROFOTÔMERO (Absorbância)
Controle: Não Inoculado (G1)	0,066
Controle: Inoculado e Não tratado (G2)	0,464
Controle Positivo: Nistatina (G3)	0,051
Loção 24% (G4)	0,056
Óleo Essencial (G5)	0,089
Extrato Hidroalcoólico (G6)	1,230
Carbopol (G7)	0,682

De acordo com os resultados pode-se observar que a ação da loção a 24%, de óleo essencial de Alecrim, seguida do óleo essencial de alecrim, se equiparou ao tratamento com nistatina, que é o antifúngico de eleição para os quadros clínicos de estomatite por *Candida* e também para o controle do biofilme bucal. Entretanto, é conhecido os efeitos adversos e a resistência estabelecida aos antifúngicos de uso tradicional (CHANDRA et al., 2001) sendo que a possibilidade do uso de extratos vegetais, representa inúmeras vantagens, principalmente tratando-se de produtos naturais com mecanismo de ação desconhecido aos patógenos, o que dificulta a

resistência e abre a possibilidade de opção terapêutica para estes quadros (ANDRADE, 2008). Observou-se que, no tratamento G1 (não inoculado), apenas corado para controle do teste, a leitura foi próxima aos grupos tratados (G3, G4 e G5), fato que demonstra que a metodologia é aplicável para quantificação do biofilme em resinas, e também reforça a efetividade dos tratamentos na eliminação do biofilme.

Os resultados dos tratamentos com loção e óleo essencial de alecrim apresentam-se promissores, pois segundo a literatura o biofilme dental é o fator de maior importância na etiologia das doenças periodontais, apresentando uma relação muito grande com a má higiene oral e a colonização por *Candida*. Além disso, o biofilme dental, pode ser um fator desencadeante da candidose oral, que é a infecção mais comum em humanos, principalmente os imunocomprometidos, podendo ocorrer disseminação sistêmica e alta mortalidade (PEREIRA, 1999; ALVES et al., 2009).

Com relação ao G6, este não apresentou redução do biofilme, ao contrário, aparentemente propiciou o desenvolvimento, favorecendo o crescimento da levedura quando comparado aos outros tratamentos (G7 e G2). Os resultados podem ter ocorrido por resistência de *C. albicans* a este extrato, ou ainda a não fixação do extrato ao bloco de prova.

Os resultados observados no G7 já eram esperados, pois com relação à adesão de *Candida* spp. às superfícies de próteses dentárias, vários trabalhos tem sido desenvolvidos (BUSSCHER et al., 2010) demonstrando que a adesão também depende do tipo de material empregado (NEVZATOGLU et al., 2007). Ao avaliar a influência da rugosidade superficial, bem como superfícies livres de energia e saliva na adesão das espécies de *Candida* em próteses acrílicas, foi demonstrado que as superfícies rugosas propiciam maior adesão do que as lisas (BUSSCHER et al., 2010)

O uso de extratos vegetais como de *R. officinalis* utilizado no estudo, tem despertado interesse da comunidade científica, que busca produtos com eficácia comprovada e efeitos adversos mínimos, além de custos reduzidos. Neste sentido, Chifiriuc e colaboradores (2012) combinou as propriedades de nanopartículas (20nm) com atividade antimicrobiana do óleo essencial do *R. officinalis*, demonstrando forte inibição da capacidade de adesão e de desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* em catéteres. Enquanto, Alves e colaboradores (2009) demonstraram que os extratos hidroalcoólicos da aroeira-do-sertão, goiabeira e malva apresentaram *in vitro* potencial atividade antimicrobiana e antiaderente sobre os microrganismos formadores no biofilme dental. Para Reis e colaboradores (2011) os extratos das folhas de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e goiabeira (*Psidium guajava* L), não foram efetivos na inibição da formação do biofilme por *C. albicans*. Entretanto, avaliação dos extratos de *R. officinalis* na inibição do biofilme dentário não foram encontrados na literatura, demonstrando a importância do estudo.

4 CONCLUSÃO

A loção e o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* inibiram a formação do biofilme por *C. albicans* em material de prótese dentária, podendo vir a serem opções para o controle do biofilme e, desta forma da candidose oral. No entanto, o extrato hidroalcoólico de alecrim não apresentou ação na redução do biofilme.

5 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. Editora roca, 2008.
- ALVES, D.L.N. *Candida* spp. e Prótese Dentária Removível: Monografia apresentada para obtenção do grau Licenciado em Medicina Dentária Faculdade de Ciências da Saúde: **Universidade de Fernando Pessoa**; 75 páginas. 2009.
- ALVES, P.; QUEIROZ, L.M.; PEREIRA, J.; PEREIRA, M.S. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.222-224, 2009.
- BUSSCHER, H.J.; RINASTITI, M.; SISWOMIHARDJO, W.; VAN DER MEI, H.C. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. **Journal of Dental Research**, v.89, n.7, p.657-65, 2010.
- CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, D.M.A. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of bacteriology**. V. 183, n.18, p.5385-5394, 2001.
- CHIFIRIUC, Carmen; GRUMEZESCU, Valentina; GRUMEZESCU, Alexandru; SAVIUC, Crina; LAZAR, Veronica; ANDRONESCU, Ecaterina. Hybrid magnetite nanoparticles/ *Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. **Nanoscale Research Letters**, Vol.7(1), pp.1-7, 2012.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.
- Farmacopéia Brasileira**. Parte I, 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Paginação irregular.
- FERREIRA, M.A.F.; PEREIRA-CENCI, T.; VASCONCELOS, L.M.R.; CUNHA, R.; RODRIGUES-GARCIA, M.; DEL BEL CURRY, A.A. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. **Clinical Oral Investigations**, v.13, n.2, p.237-242, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum: São Paulo, 2002, p.261.
- NEVZATOGLU, E.U.; OZCAN, M.; KULAK-OZKAN, Y.; KADIR, T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. **Clinical Oral Investigations**, v.11, n.3, p.231-236, 2007.
- PEREIRA, C.V. Ação das amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase dentária – estudo *in vitro*. **Revista Passo Fundo**, v.4, p.33-39, 1999.
- RAMOS, I.C.; VASCONCELOS, L.S.; LIMA, M.C.; FIGUEIREDO, R.Q. Candidose Bucal em pacientes HIV- positivos. **Jornal brasileiro de odontologia clínica**, v.3, n.13, p.59-61, 1999.
- REIS, N.; LELIS, T.; MENDONÇA, A.; CHAVASCO, J.K. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.9, n.2, p.337-343, 2011.
- WANDER, J.S.; RACHED, R.N.; ROSALEN, P.L.; DEL BEL CURRY, A.A. Effects of Nystatin, Fluconazole and Propolis on Poly (Methyl Methacrylate) Resin Surface. **Brazilian Dent Journal**, v.19, n.3, p.190-196, 2008.