



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCETIBILIDADE DE LEVEDURAS FRENTE A ANTisséPTICOS ORAIS

SILVA, Franklin de Moraes Vaz¹; SANTIN, Rosema²; MATTEI, Antonella Souza³; MADRID, Isabel Martins³; NASCENTE, Patrícia da Silva⁴; MELLO, João Roberto Braga⁵; MEIRELES, Mário Carlos Araújo⁶

¹Bolsista IC/FAPERGS - Graduando em Medicina Veterinária/UFPeI

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFRGS

³Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPeI

⁴Professor Adjunto, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia/UFPeI

⁵Professor Associado, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS

⁶Professor Associado, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária/UFPeI
Departamento de Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Infecciosas - Setor Micologia/UFPeI
- Campus Universitário, s/nº; Capão do Leão/RS, CEP 96010-900 franklin.vaz@web.de

1. INTRODUÇÃO

Uma diversidade complexa de microrganismos entre bactérias e leveduras habitam a cavidade oral de humanos e animais. Estes microrganismos podem ser responsáveis por diversas enfermidades na própria cavidade oral e também de envolvimento sistêmicos, como por exemplo, em quadros de endocardite (Trabulsi & Sampaio, 2005). Neste contexto, a identificação destes agentes torna-se de grande importância para fornecer suporte clínico, auxílio no diagnóstico e terapia das doenças (Braga et al., 2005). As bactérias de importância na cavidade oral que estão relacionadas a quadros de periodontite e ferimentos causados por mordeduras são principalmente do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* (Verstraete, 1998, Braga et al., 2005; Trabulsi & Sampaio, 2005; Nishiyama et al., 2007). As leveduras descritas como parte da microbiota oral são *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* spp. e *Candida* spp. (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Bond; Saijonmaa-Koulumies; Lloyd, 1995; Bond & Lloyd, 1997; Pachaly & Gioso, 2001; Braga et al., 2005; Cleff et al., 2005; Brito et al., 2008).

Os antissépticos orais auxiliam na redução da concentração de microrganismos patogênicos e comensais da cavidade oral e, conseqüentemente na redução da formação da placa dental por estes agentes, sendo que uma vez estabelecida, estes produtos não possuem a capacidade de removê-la, tão pouco o cálculo dentário. Os principais antissépticos usados em veterinária são a clorexidina, iodo polivinil-pirrolidona, triclosan, compostos de amônia quaternária, e também compostos fenólicos (Gioso & Carvalho, 2004).

Devido à aproximação cada vez maior dos animais de estimação junto dos seus proprietários, mais estudos sobre saúde oral em pequenos animais têm sido realizados nos últimos anos (Gioso, 2003; Gioso & Carvalho, 2004). O objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de caninos frente a antissépticos orais usados na rotina odontológica e seus princípios ativos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o teste de suscetibilidade *in vitro* foram utilizados 15 isolados provenientes de sítios distintos da cavidade oral de caninos, sendo selecionadas duas cepas de *M. pachydermatis*, duas de *C. albicans*, duas de *C. catenulata*, uma de *C. guilliermondii*, uma de *C. parapsilosis*, uma de *C. intermedia*, duas de *Rhodotorula* spp., três de *T. asahii* e uma de *T. mucoide*.

Foram testados dois antissépticos orais disponíveis no mercado para pequenos animais, sendo o produto A¹ composto por gluconato de clorexidina 0,12%, cloreto de benzalcônio 0,12% e extrato de clorofila 0,10% e produto B² composto por tintura de própolis 1%, cloreto de benzalcônio 0,2% e aroma hortelã-pimenta 0,5%. Também foram analisados os princípios ativos gluconato de clorexidina nas concentrações de 0,24%, 0,12% e 0,06%, cloreto de benzalcônio a 0,48%, 0,24%, 0,12% e 0,06% e tintura de própolis a 2%, 1% e 0,5%. As diluições dos princípios foram realizadas em meio RPMI-1640³ e, para cepas de *M. pachydermatis* utilizou-se Sabouraud dextrose líquido.

Os inóculos fúngicos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento de 24h em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol a 36°C. Após foram suspensos em solução salina estéril e homogeneizados, sendo ajustados de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a aproximadamente 5×10^6 CFU mL⁻¹. A diluição 1:50 foi preparada transferindo-se 100µl desta suspensão para 4,9mL de solução salina estéril e a diluição de 1:20 foi através da transferência de 250µl da suspensão anterior em 4,75mL em meio RPMI-1640 e/ou Sabouraud dextrose líquido, sendo que desta diluição foram distribuídos 100µl nos poços das microplacas em duplicata que também continham 100µl dos produtos a serem testados e suas diluições. Após, as placas foram incubadas a 36°C para posterior leitura.

A leitura da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi realizada em 24, 48 e 72 horas de incubação comparando visualmente o crescimento da levedura nos poços do controle positivo com o crescimento nos poços referentes aos produtos A e B e às diferentes concentrações dos compostos testados. Para confirmação dos resultados da CIM, foi retirado 5µL de todos os poços das concentrações e produtos testados e estes foram semeados em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubados a 36°C por 48h quando foi realizada leitura e estabelecida a CFM (Concentração Fungicida Mínima).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

¹ Eti-mag solução bucal® - Leivas Leite S.A., Pelotas, RS.

² Doctor Doggy Halitart sabor menta® - VetLabo, Porto Alegre, RS.

³ Roswell Park Memorial Institute; Sigma Chemical Co., St Louis, MO.

Foi observada a inibição do crescimento de todas as leveduras estudadas nos produtos A e B e em todas as concentrações dos princípios, com exceção das concentrações da tintura de própolis que não demonstraram ação em nenhuma das concentrações testadas. Na literatura foram encontradas descrições do uso de soluções bucais apenas em humanos para redução de leveduras, não sendo encontrados estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* das leveduras frente às soluções bucais utilizadas em pequenos animais.

O cloreto de benzalcônio, neste estudo, promoveu inibição do crescimento das leveduras nas concentrações 0,06%, 0,12%, 0,24% e 0,48%. Este resultado foi semelhante aos encontrados na utilização deste como desinfetante a 0,5% contra espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Gupta; Ahmad; Summerbell, 2002).

O gluconato de clorexina inibiu o crescimento das leveduras nas concentrações de 0,06%, 0,12% e 0,24%, e dentre os antissépticos orais utilizados na clínica de pequenos animais, a clorexidina é o produto mais eficaz, pois possui efeito bactericida imediato, poder de retenção, período de ação de 12h (Hennet, 2002; Gioso & Carvalho, 2004). Os resultados deste estudo foram semelhantes aos encontrados na literatura que demonstraram a atividade antifúngica *in vitro* frente a *C. albicans* de 0,5% e 0,05% de acetato clorexidina (Waltimo et al., 1999). Em outro estudo *in vitro*, o digluconato de clorexidina nas concentrações de 0,12% e 0,2% controlaram a presença de diferentes espécies de *Candida* e reduziram a colonização oral por esses microrganismos (Meiller et al., 2001).

A atividade antimicrobiana da própolis frente a leveduras já foi demonstrada, inclusive cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentaram-se sensíveis até mesmo a baixas concentrações desta (Sforcin et al., 2001). Através da difusão em ágar, a suscetibilidade *in vitro* de bactérias bucais contra diferentes tinturas fitoterápicas demonstraram atividade antibacteriana da tintura de própolis frente a todos isolados, porém em diferentes diluições (Soares et al., 2006). No presente estudo, todas as concentrações utilizadas da tintura de própolis (2%, 1% e 0,5%) não apresentaram atividade antifúngica frente às leveduras analisadas.

4. CONCLUSÃO

Os princípios gluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e os produtos comerciais utilizados como antissépticos orais demonstraram atividade e foram eficazes contra as leveduras analisadas. A utilização da tintura de própolis nas concentrações testadas como antisséptico oral não é recomendada, pois não foi eficaz para as leveduras em estudo.

AGRADECIMENTOS: FAPERGS, CAPES e CNPq.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E. M.; LLOYD, D. H. Population size and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 147-150, 1995.
- BOND, R.; LLOYD, D. H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrheic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 101-106, 1997.

BRAGA, C. A. B.; RESENDE, C. M. F.; PESTANA, A. C. N. R.; CARMO, L. S.; COSTA, J. E.; SILVA, L. A. F.; ASSIS, L. N.; LIMA, L. A.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 385-390, 2005.

CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Candida spp.* from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 201-204, 2005.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **The Veterinary Journal** (2008), doi: 10.1016/j.tvjl.2008.07.001.

GIOSO, M. A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 5. ed. São Paulo: Imed, 2003, p. 202.

GIOSO, M. A.; CARVALHO, V. G. G. Métodos preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n. 52, p. 68-76, 2004.

GUPTA, A. K.; AHMAD, I.; SUMMERBELL, R. C.; Fungicidal activities of commonly used disinfectants and antifungal pharmaceutical spray preparations against clinical strains of *Aspergillus sp.* and *Candida spp.* **Medical Mycology**, v. 40, p. 201-208, 2002.

HENNET, P. Effectiveness of a dental gel to reduce plaque in beagle dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 19, n. 1, p. 11-14, 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNET, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992, 866p.

NISHIYAMA, S. A. B.; SENHORINO, G. N. A.; GIOSO, M. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 23-28, 2007.

MEILLER, T. F.; KELLEY, J. I.; JABRA-RIZK, M. A.; DePAOLA, L. G.; BAQUI, A. A. M. A.; FALKLER Jr, W. A. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 91, p. 663-670, 2001.

PACHALY, J. R.; GIOSO, M. A. The Oral Cavity. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. Biology, Medicine and Surgery of South – American Wild Animals. Ames, 2001, p. 457-463.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; FUNARI, S. R. C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. v. 7, n. 1, Botucatu, 2001.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B. L. C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 53, 2006.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. C. Microbiota ou Flora Normal do Corpo Humano. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM. **Microbiologia**, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, cap. 12, p. 101-109.

VERSTRAETE, F. J. M. Patologia e Microbiologia Dentárias. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, 2. ed. São Paulo: Manole, 1998, v. 2, cap. 176, p. 2733-2743.

WALTIMO, T. M. T.; ORSTAVIK, D.; SIRÉN, E. K.; HAAPASOLO, M. P. P. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 421-429, 1999.