ANÁLISE DA TOXICIDADE EM INVERTEBRADO DE ADESIVOS PROTÉTICOS CONTENDO ANTIFÚNGICOS.

Giulia Cristina Antonello Giese (BIC - Fundação Araucária), Josiane Loch Ribeiro (co-orientadora - UEPG); Luiz Ricardo Zander (UEPG); Nara Hellen Campanha Bombarda (Orientadora), e-mail: narahell@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento Odontologia.

Odontologia 4.02.00.00-0 /Materiais odontológicos 4.02.09.00-8

Palavras-chave: *Artemia salina,* nitrato de miconazol, nistatina, dose letal.

Resumo

A estomatite protética é uma forma comum de candidose oral em áreas recobertas por próteses removíveis. Na busca por tratamentos mais eficientes, estudos investigam a inclusão de fármacos antifúngicos em adesivos para próteses. Visando o aumento da biodisponibilidade e liberação controlada de antifúngicos na cavidade oral, realizou-se a produção de micropartículas poliméricas de nitrato de miconazol e nistatina, pelo método de spray-drying, as quais foram adicionadas a adesivo experimental e comercialmente disponível. Analisou-se a toxicidade destas formulações adesivas puras ou com antifúngicos encapsulados pelo bioensaio toxicológico com *Artemia salina* e calculou-se a DL_{50}.

Introdução

A estomatite protética (EP) é uma lesão inflamatória fúngica que acomete a mucosa de suporte coberta por próteses removíveis, clinicamente classificada em hiperemia puntiforme, hiperemia difusa, hiperplasia papilar inflamatória (Barbeau et al., 2003). Possui causa multifatorial, cujo fator etiológico é a *Candida albicans* (Scalercio et al., 2007). Um fungo comensal porém com o declínio de fatores locais e/ou sistêmicos se torna oportunista (Castellote et al. 2013). Os principais agentes antifúngicos de uso tópico no tratamento da EP são a nistatina (N) (Hilgert et al., 2016) e nitrato de miconazol (NM)(Samaranayake et al 1994). O NM é pó cristalino branco pouco solúvel em água, apresentado para uso tópico em gel a 2%(Farmacopeia 2010). A N é um pó fino, amarelo praticamente insolúvel em água, apresentada para uso tópico em suspensão (Brasil, 2010). Salivação, deglutição, fala e mastigação podem deslocar e diluir o fármaco antifúngico aplicado na cavidade oral (Cardot et al., 2004), reduzindo seu tempo de permanência no local e sua biodisponibilidade (Gupta et al.1993). Estudos tem sido conduzidos com intuito de buscar terapias alternativas para o tratamento da EP, como a inclusão de fármacos antifúngicos em formulações adesivas comercialmente disponíveis (Garaicoa et al., 2016). Esta opção tem sido pesquisada na UEPG, confeccionando-se adesivo para prótese removível acrescido de micropartículas poliméricas para liberação controlada de NM e N, visando aumentar sua biodisponibilidade e tempo de permanência no seu local de ação e melhorar a adaptação e conforto da prótese. Buscando-se a segurança da utilização destes novos adesivos, o objetivo deste estudo foi avaliar preliminarmente a toxicidade, pelo bioensaio com *Artemia salina,* que avalia a capacidade potencial

de uma substância em causar um efeito nocivo a organismos vivos (Rand et al. 1995).

Materiais e Métodos

Foram avaliados os seguintes materiais: Experimento 1 - Adesivo comercialmente disponível amplamente utilizado (Ultra Corega®, sem sabor, 40 g, Stafford-Miller Ind Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e adesivo experimental (AdEx), puros e incorporados com micropartículas poliméricas EG-NM20, E-N10, E-N20 e EG-N20. Experimento 2 - Adesivo Corega®, Ad.Ex puro e incorporado com EG-NM20. Experimento 3 - Micropartícula E-N20 pura. Os adesivos foram testados em diluições seriadas nas concentrações P/V de 2% a 0,005%, o nitrato de miconazol (NM) incorporado em concentração teórica final (P/V) de 0,08 g a 0,0002 g e a nistatina (N) testada em concentração teórica final de 200.000 UI a 2.000 UI. Os experimentos foram acompanhados de controle positivo pelo dicromato de potássio a 0,1% e controle negativo pela solução salina pura.
As micropartículas poliméricas foram adaptadas de Cartagena et al.(Cartagena et al. 2017), e produzidas a partir dos polímeros Eudagrit® L100 (E, Evonik Industries, Essen, Alemanha), Gantrez MS-955 (G, ISP, Wilmington, Delaware, EUA). Após preparados eram agitadas mecanicamente (800 rev.min^{-1}), a EF-NM20 por 4 h e a E-N10, EM-20 e EG-N20 por 12 h, e então passadas pelo equipamento spray-dryer MSD-0,5-mini-secador por pulverização (Ladmaq do Brasil Ltda, Brasil).
O AdEx foi adaptado de Cartagena et al. (Cartagena et al. 2017) e produzido a partir de polímeros hidrossolúveis, materiais de ligação e conservantes e então misturados mecanicamente a vácuo a 2400 rpm durante 15 minutos. Na incorporação das micropartículas poliméricas ao AdEx e Corega® (1g de adesivo / 0,1g de micropartícula), utilizou-se misturador mecânico a vácuo (SpeedMixer - 3 ciclos de 2400 rpm.min^{-1}). Para obtenção da solução mãe todos as amostras foram mantidas sob agitação mecânica constante (800 rev.min^{-1}), à temperatura de 30 ºC, por 12 h.
O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi adaptado de Meyer et al.(Mayer et al. 1982). Foram colocados 100mg de ovos de *A. salina* (Carolina Biological Supply Company, Burlington, EUA), em um recipiente preparado com água salgada artificial, em temperatura 28 ºC a 30 ºC, pH entre 8 e 9 e em aeração, durante 48 h para a eclosão dos ovos. Em triplicata, as formulações, foram preparadas no volume de 5 mL e diluídas nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL de solução mãe. Dez larvas de *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo as amostras a serem testadas. Após 24 h e 48 h, o resultado foi obtido pela contagem de larvas vivas (a falta de movimentação por 10 s indica sua morte). Para obtenção dos valores de DL_{50} foi utilizada a análise estatística de Probti com o método Finney (distribuição Log-normal) com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

No bioensaio com *A. salina*, a dose letal média (DL_{50}) é a dose e/ou concentração de uma dada amostra necessária para causar mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição testado (Mayer et al., 1982). No Experimento 1, todas as formulações de adesivo experimental e Corega® tanto puro e acrescido micropartículas, no tempo de incubação de 24 h, comportaram-se semelhantes aos controles. Com base nesses achados os materiais apresentam-se atóxicos na dose

testada de 1 mg/1 mL, não tendo sido possível o cálculo da DL_{50}, pois não houve mortalidade significativa. No Experimento 2, no tempo de 24 h, o Corega® apresentou DL_{50}= 1.098,57 µg/ml, o adesivo experimental a 2%, DL_{50}= 984,85 µg/ml e o adesivo experimental a 2% com EG-NM20 a 4%, DL_{50}= 1.162,25 µg/ml. Estes materiais apresentaram toxicidade muito baixa, visto que a DL50 foi muito alta. No tempo de 48 h, o adesivo Corega®, apresentou DL_{50}= 755,69 µg/ml, o adesivo experimental a 2%, DL_{50}= 437,78 µg/ml e o adesivo experimental a 2% com EG20 a 4% DL_{50}= 315,83 µg/ml. Estes materiais podem ser considerados tóxicos, pois apresentaram DL_{50} >1000 µg/ml. Segundo a Organização mundial da saúde (OMS), são consideradas tóxicas as substâncias que apresentam valores de DL_{50} abaixo de 1000 µg/ml em *A. salina* (Mayer et al., 1982). No Experimento 3, a micropartícula de Nistatina E-N20, testada no dobro da dose clinica para o tratamento da candidíase oral, com 24 h de incubação, todas as larvas de *A. salina* estavam mortas, sendo considerada potencialmente toxica.

O teste de *A. salina* é relativamente fácil e barato, usado como avaliação preliminar da toxicidade de uma ampla gama de materiais. Cartagena et al. (Cartagena et al., 2017) quantificaram a toxicidade de adesivo experimental com adição de micropartículas de nitrato de miconazol em *A. salina*, sendo que todas as suas formulações de adesivos apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade. Os estudos de Gomes et al. (Gomes et al., 2010) e Ekstrand et al. (Ekstrand et al., 1993) também testaram a toxicidade de adesivos, inclusive o adesivo Corega® creme, mas diferindo deste estudo porque avaliaram citotoxicidade em fibroblastos L929. Apesar das diferenças metodológicas, estes estudos apresentaram resultados similares aos do presente estudo, mostrando graus de toxicidade dependentes da concentração/dose e do tempo de exposição.

Conclusões

A toxicidade dos adesivos experimental e comercial acrescidos de micropartículas antifúngicas de nitrato de miconazol e nistatina é dose- dependente.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, pela bolsa de Iniciação Científica concedida.
Ao professor Fabio André dos Santos, pela ajuda no desenvolvimento da analise estatística.

Referências

BARBEAU, J. et al. **Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, St. Louis, v.95, n.1, p. 51-59, jan. 2003.

SCALERCIO, M. et al. **Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento**. RGO - Revista Gaúcha de Odontologia, Porto Alegre, v.55, n.4, p. 395-398, out./dez. 2007.

CASTELLOTE L. C., E SORIANO Y. J. **Review clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis.** Journal of Clinical and Experimental Dentistry, Valencia, v.5, n.5, p.279-86, ago./set. 2013.

HILGERT J. B. et al. **Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-analysis**. Journal of the American Geriatrics Society, Filadelfia, v.64, n.12, p.2539-2545, dec.2016

SAMARANAYAKE LP, FERGUSON MM. **Delivery of antifungal agents to the oral cavity**. Advanced Drug Delivery Reviews – Journal, Amsterdam, v.13, p.161–179, jan./feb. 1994.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2, 5. ed., Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

CARDOT JM, CHAUMONT C, DUBRAY C, COSTANTINI D, AIACHE JM. **Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects.** British Journal of Clinical Pharmacology, Clermont-Ferrand, v.58, n.4, p.345-351, oct. 2004.

GUPTA A, GARG S, KHAR RK. **Measurement of bioadhesive strength of mucoadhesive buccal tablets: Design of an in vitro assembly**. Indian Drugs Journal, Bombay, v. 30, p.152-155, 1993.

GARAICOA J. L. et al. **Promise of combining antifungal agents in denture adhesives to fight candida species infections**. American college of prosthodontists, SW Moody Ave, p.1-8, nov. 2016.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment.** 2. ed., Washington: 1995.

CARTAGENA AF, ESMERINO LA, POLAK-JUNIOR R, OLIVIERI PARREIRAS S, DOMINGOS MICHÉL M, FARAGO PV, CAMPANHA NH. **New denture adhesive containing miconazole nitrate polymeric microparticles: Antifungal, adhesive force and toxicity properties.** Dental Materials Journal, Nuremberg, v.33, n.2, p.53-61, feb. 2017.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Medica, West Lafayette, v.45, n.5, p.31-34, may. 1982.

GOMES P. S; FIGUEIRAL M. H; FERNANDES M. H. R; SCULLY C. **Cytotoxicity of denture adhesives.** Clinical Oral Investigations, Porto, v.15, p.885-893, set. 2010.

EKSTRAND K, HENSTEN-PETTERSEN A, KULLMANN A. **Denture adhesives: cytotoxicity, microbial contamination, and formaldehyde content**. The Journal of prosthetic dentistry, St. Louis, v.69, n.3, p. 314-317, mar. 1993.