AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS MICROBIOLÓGICOS PROMOVIDOS PELA INCORPORAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE NISTATINA EM UM ADESIVO PARA PRÓTESES REMOVÍVEIS

Luiz Ricardo Marafigo Zander (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Nara Hellen Campanha Bombarda (Orientadora), e-mail: narahell@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia

Área: 4.02.00.00-0 Odontologia
Sub área: 4.02.09.00-8

Palavras-chave: Nistatina, Adesivos e tecidos, *Candida albicans*.

Resumo
O desenvolvimento de novas formulações de adesivos para próteses removíveis (APR), modificados pela adição de antifúngicos vem de encontro às necessidades e anseios dos usuários desses materiais. Assim, o objetivo específico do presente subprojeto foi avaliar o efeito isolado das micropartículas poliméricas e da incorporação delas para liberação de nistatina numa formulação experimental de adesivo para próteses removíveis na atividade antifúngica do fármaco, pelo método de difusão em ágar. Ademais, verificar a susceptibilidade de cepa padrão de *Candida albicans,* ao fármaco puro, às micropartículas poliméricas e ao APR acrescido das mesmas pelo método de microdiluição em caldo, além de determinar a concentração fungicida por meio do método de plaqueamento. Os resultados revelaram pouca significância estatística entre os compostos aos testes de Kruskal-Wallis e Comparações múltiplas de Dunn e microbiologicamente, superioridade das micropartículas de EudragitGantrezNistatina20% (EGN20) puras ao teste de Difusão em ágar. Sendo assim, antes da utilização desses compostos em seres humanos é necessária a realização de estudos mais aprofundados.

Introdução

A estomatite protética é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência na mucosa subjacente à prótese em pacientes portadores de próteses removíveis parciais ou totais convencionais (EMANI et al., 2012). Sua prevalência tem sido demonstrada variando de 10% a 75% em usuários de próteses removíveis (MACIEL, 2008). Os pacientes acometidos podem-se queixar de sensação de queimação, paladar desagradável, e desconforto, mas a maioria dos casos é assintomática e esses indivíduos podem nem ter consciência do problema (NEWTON, 1962). A combinação entre fatores sistêmicos como deficiências nutricionais, diabetes, xerostomia, imunossupressão e fatores locais como trauma pela prótese, infecção por fungos e bactérias, higienização deficiente e alergia ao monômero, podem predispor pacientes à estomatite protética, tendo o microrganismo oportunista pertencente ao gênero *Candida*, a *Candida albicans*, como principal fator etiológico (SESMA e MARIMOTO, 2011).
Em pacientes específicos (com fatores que dificultam a retenção protética como xerostomia e/ou reabsorção alveolar) pode ser necessária a utilização de

APR, que são produtos farmacêuticos manufaturados, não estéreis, que têm como finalidade aumentar a retenção da prótese, proporcionando maior conforto e segurança ao seu usuário (PIERALINI et al., 2010).
Dessa forma, abordagens terapêuticas que associem a disponibilidade de antifúngicos no local acometido pela Estomatite Protética à melhoria da retenção e estabilidade das próteses removíveis convencionais podem ser bem sucedidas (GUSMÃO e PEREIRA, 2012).
O desenvolvimento de novas formulações de adesivos para próteses, modificados pela adição de antifúngicos vem de encontro às necessidades dos usuários desses materiais, tanto em condições hígidas quanto em presença de Estomatite Protética. Para isso, testes preliminares de verificação de inibição microbiológica devem ser realizados a fim de se indicar com segurança essas modificações da composição básica dos adesivos para próteses removíveis.

Materiais e Métodos

Preparo dos compostos utilizados

Após a produção das seis diferentes formulações das micropartículas poliméricas e da produção do APR de acordo com a formulação final, ambos os compostos foram unidos na proporção 9:1 (APR:micropartícula polimérica), primeiramente em mistura física e em seguida agitados em Speed Mixer, dando 3 ciclos de 3000 rotações por minuto, realizando nova mistura física a cada ciclo, resultando assim nos doze compostos a serem testados. Em seguida, eles foram dissolvidos na proporção de 1mg de composto para 1 mL de água destilada e agitados durante 30 minutos em agitador magnético, resultando nas diferentes dissoluções.
As dissoluções que apresentaram conteúdo oleoso, provindo dos componentes do APR, foram filtradas utilizando filtro de porosidade de 3 micras e a nistatina, por ser insolúvel em água, foi dissolvida em Dimetilsulfóxido (DMSO) na mesma proporção (1mg:1mL).

Descontaminação dos compostos utilizados

Todas as dissoluções obtidas foram esterilizadas por meio da exposição a luz ultravioleta em fluxo laminar, durante 20 minutos, previamente a realização de cada um dos testes.

Microdiluição e replaqueamento

Na técnica de microdiluição foram preparadas concentrações a partir de suspensões de cultura de 24 horas de *Candida albicans* American Type Culture Collection 10231 (ATCC 10231) preparados por espectrofotometria na concentração de 1 na escala de McFarland de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o Roswell Park Memorial Institude 1640 (RPMI 1640) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), com potencial hidrogeniônico 7,0 (pH 7,0) neutralizado com ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico 0,165 M (MOPS 0,165 M) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), glicose 2%. Em seguida, em fluxo laminar, cem microlitros de inóculo fúngico foram adicionados a cada orifício da placa de 96 orifícios que continha 100 µL do extrato de alguma das seis diferentes formulações de APR desenvolvidas contendo as micropartículas poliméricas ou alguma das seis micropartículas poliméricas obtidas, além de 100 µL de meio de cultura.
Orifícios controle (sem antifúngico, só com APR, inóculo e meio de cultura) também foram incluídos e outros foram mantidos sob as mesmas condições, porém não receberam os inóculos como controle da esterilidade das placas (apenas meio de cultura). Além disso, foram incluídos orifícios contendo

meio de cultura, nistatina e inóculo, utilizados como o padrão ouro na inibição de crescimento visível, outros contendo apenas meio de cultura e inóculo, e outros contendo apenas meio de cultura e dissoluções, fornecendo dessa forma subsidio para a realização da análise estatística de dados. As placas que continham inóculo foram incubadas a 35°C durante 48 horas observando presença ou ausência de crescimento visível. Os poços de microdiluição receberam uma pontuação (escore) e o crescimento em cada poço foi comparado com o controle (isento de droga). Os testes foram realizados em triplicata em três dias diferentes. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas de acordo com uma escala de 0 a 4 após a leitura em leitor ELISA das placas de 96 orifícios. Após isso, foi coletado material dos orifícios, utilizando swabs estéreis, para plaqueamento em ágar Sabouraud. As novas placas foram incubadas por 24 horas a 37 ± 0,5°C e a concentração fungicida (que impediu o crescimento fúngico) procurou ser determinada por meio da observação das mesmas.

Difusão em ágar

A difusão em ágar foi realizada em placas de Petri contendo meio ágar Müeller Hinton inoculado com 50 µL de suspensões de cultura de 24 horas de *Candida albicans ATCC 10231* na concentração de 0,5 da escala de McFarland, utilizando swabs estéreis. Poços de 7 mm de diâmetro foram confeccionados no ágar e preenchidos com 50 µL contendo extrato das diferentes doze dissoluções desenvolvidas a partir das micropartículas poliméricas puras ou das micropartículas poliméricas obtidas acrescidas de APR. Além disso, foram incluídos poços contendo solução de nistatina e também de APR puro, todos em uma concentração teórica de 50 $\mu g.mL^{-1}$, fornecendo desta forma o subsídio necessário para a realização da análise estatística de dados. As placas foram incubadas (24 horas a 37 ± 0,5ºC). O diâmetro dos halos de inibição foi mensurado em mm, utilizando o software ImageJ. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata e em dias diferentes.

Resultados e Discussão

Após a realização dos experimentos foram aplicados os testes de Kruskal- Wallis e Comparações múltiplas de Dunn nos resultados obtidos. Assim, ao teste de microdiluição em caldo foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre Nistatina+meio+inóculo e APR+EudragitNistatina20%+meio+inóculo, além de Nistatina+meio+inóculo e APR+GantrezNistatina20%+meio+inóculo. Já ao teste de difusão em ágar foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre Nistatina quando comparada a APR, APR+EudragitNistatina10%, APR+EudragitNistatina20%, APR+GantrezNistatina10%, APR+GantrezNistatina20%, EudragitNistatina10%, EudragitNistatina20%, GantrezNistatina10%, GantrezNistatina20%, EudragitGantrezNistatina10%, EudragitGantrezNistatina20%.
Embora não haja muitos resultados estatisticamente significativos, as micropartículas EudragitNistatina20% e EudragitGantrezNistatina20% isoladas apresentaram bons resultados de halo no teste de Difusão em Ágar se comparado aos demais compostos, o que microbiologicamente é um resultado significativo, de acordo com OSTROSKY, E. A. et al., 2008 (halo superior ou igual a 10 mm). Ademais, não foi possível determinar as concetrações inibitórias mínimas porque nenhum dos compostos desenvolvidos, nessas concentrações, conseguiu promover uma redução de 50% do grau de turbidez no teste de Microdiluição em RPMI 1640.

Conclusões

As micropartículas poliméricas podem ser uma alternativa ao anseio clínico de um produto eficaz na liberação contínua de fármaco para o tratamento de pacientes que possuam estomatite protética, agindo diretamente sobre a área lesada quando em conjunto com APR. No entanto, após a realização do presente subprojeto, concluiu-se que nessas concentrações, as micropartículas poliméricas apresentaram pouco potencial microbiológico para uso clínico, sendo necessários estudos mais aprofundados para determinar uma quantidade de material que corresponderia a concentração inibitória mínima da Nistatina (100.000 UI).
É importante destacar que foram eleitas essas concentrações para a realização dos testes (1 mg de composto para 1 mL de solvente) devido a escassez de material base para a produção dos compostos e grande dificuldade em conservação do aparelho de Spray Dryer (utilizado na produção das micropartículas poliméricas), o que resultou em resultados acentuadamente insatisfatórios.

Agradecimentos

Primeiramente a Fundação Araucária/UEPG que forneceram subsídio financeiro e físico para a realização dos experimentos, a minhas orientadoras Dra. Nara e Josiane e a minha família e amigos.

Referências

EMANI, E. et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. **Int J Prosthodont**, Lombard, v. 25, n. 2, p. 113-119, mar-abr. 2012.

MACIEL, S. S. S. V. et al. Prevalência das lesões de tecidos moles causadas por próteses removíveis nos pacientes da Faculdade de Odontologia de Caruaru, PE, Brasil. **Pesqui Bras Odontop Clín Integr**, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 93-97, 2008.

GUSMÃO, J. M. R.; PEREIRA, R.P. Treatment protocol for denture stomatitis, prior to anatomical molding**. Gerodontology**, Oxford, v. 30 , n. 3 , p. 232-235 , abr. 2012.

NEWTON, A. V. Denture sore mouth: A possible aetiology. **Br Dent J**, Londres, v. 112, n. 9, p. 357-360, maio. 1962.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacog**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PIERALINI, A. R. F. et al. Esclarecendo o uso de fixadores para prótese total**.** **Rev ABO Nac**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 112-116, fev-mar. 2010.

SESMA, N.; MARIMOTO, S. Estomatite protética: Etiologia, tratamento e aspectos clínicos. **J Biodent Biomat**, São Paulo, n. 2, p. 24-29, set-fev. 2011.