SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* FRENTE A MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO GUIADA DE NISTATINA, VISANDO A INCORPORAÇÃO EM ADESIVOS PROTÉTICOS

Luiz Ricardo Marafigo Zander (PIBIC/CNPq), Nara Hellen Campanha Bombarda (Orientadora), e-mail: narahell@yahoo.com.br, Cynthia Maria Schnekenberg Egg (Co-autora), Carolina Ruppel (Co-autora), Josiane Loch Ribeiro (Co-autora).

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia.

Odontologia, Prótese Removível, Materiais Odontológicos.

Palavras-chave: Estomatite protética, Micropartículas poliméricas, Nistatina.

Resumo

A estomatite protética é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência nos pacientes portadores de próteses removíveis. Para esses pacientes pode ser necessária a utilização de adesivos para próteses removíveis (APR) para melhorar estabilidade e retenção das próteses. Investigações recentes avaliaram a influência dos APR no desenvolvimento ou inibição de microrganismos orais, porém não visaram incorporar fármacos a esses materiais. Nesse sentido o objetivo do estudo em que este trabalho se insere é desenvolver formulações de APR com ação antifúngica, através da incorporação de micropartículas poliméricas de antifúngicos utilizados no tratamento da estomatite protética. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito das micropartículas poliméricas carreadoras de nistatina na susceptibilidade de cepas padrão de *Candida albicans*, pelo método de microdiluição e XTT, calcular a CIM de cada uma das micropartículas testadas, permitindo selecionar ao final do projeto as melhores formulações e futuramente oferecer um protocolo preliminar de tratamento para a estomatite protética e oferecer, com base um tratamento de baixo custo, efetivo e atóxico.

Introdução

A estomatite protética (EP) é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência nos pacientes portadores de próteses removíveis parciais ou totais (EMAMI et al., 2012) e sua prevalência varia de 10% a 75% nos usuários de próteses removíveis (BARBEAU et al., 2003). O principal fator etiológico da EP é um micro-organismo oportunista pertencente ao gênero *Candida*, a *Candida albicans*, embora a etiologia da EP seja considerada multiparamétrica BARBEAU et al., 2003).

Para pacientes que possuam pouca estabilidade e retenção pode ser necessária a utilização de adesivos para próteses removíveis, que são produtos farmacêuticos manufaturados, não estéreis, que têm como finalidade aumentar a retenção da mesma, proporcionando maior conforto e segurança ao seu usuário PIERALINI et al., 2010).

Investigações recentes avaliaram a influência dos adesivos para próteses no desenvolvimento ou inibição de microrganismos orais (POLYZOIS et al., 2013), porém não visaram incorporar fármacos a esses materiais. Sistemas de liberação controlada têm sido desenvolvidos para aumentar a biodisponibilidade dos fármacos, prolongar o tempo de liberação no organismo, sustentar sua concentração plasmática e

controlar a localização temporal e espacial, por meio de princípios químicos e biológicos (VILLANOVA; ORÉFICE e CUNHA, 2010). Dentre eles estão incluídos os sistemas poliméricos de liberação, representados pelas micropartículas, nanopartículas e os hidrogéis poliméricos (MELO; CUNHA JUNIOR e FIALHO, 2012). O desenvolvimento de novas formulações de adesivos para próteses, modificados pela adição de micropartículas contendo antifúngicos viria de encontro às necessidades e anseios dos usuários desses materiais, quando em presença de EP. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito de micropartículas poliméricas carreadoras de nistatina (previamente desenvolvidas) na susceptibilidade de cepas padrão de *Candida albicans*, pelo método de microdiluição e XTT, calcular a CIM de cada uma das micropartículas testadas, permitindo selecionar ao final do projeto as melhores formulações e futuramente oferecer um protocolo preliminar de tratamento para a estomatite protética e oferecer, com base em evidências, um tratamento de baixo custo, efetivo e atóxico, tendo um impacto positivo na sua qualidade de vida.

Materiais e Métodos

Preparo das diluições seriadas

Partindo dos dados provindos de testes de eficiência de encapsulação (RIBEIRO, 2018) das diferentes micropartículas a serem testadas (E com nistatina a 10%, E com nistatina a 20% e E com G e nistatina a 20%), pode-se determinar em gramas quanto era necessário das mesmas para se obter uma diluição equivalente a 32 µg de nistatina por mL de dimetil sulfóxido (solução mãe). Assim, após adicionar 0,00178 g de EN10 a 1 mL de DMSO, 0,00024 g de EN20 a 1 mL de DMSO e 0,00176 g de EGN20 a 1 mL de DMSO, obtiveram-se as soluções padrão. Por fim, foram diluídas sequencialmente à metade em meio RPMI 1640, obtendo-se concentrações referentes a 32 µg ,16 µg, 8 µg, 4 µg, 2 µg, 1 µg, 0,5 µg e 0,25 µg.

Microdiluição

Inicialmente uma alçada de células da cepa de *C. albicans* (ATCC SC5814) de 24 h de crescimento em ágar Sabouraud dextrose foi inoculada em tubo Falcon contendo 20 mL de meio líquido RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (Angus Buffers and Chemicals, Niagara Falls, N.Y.) acrescido de MOPS (neutralizador de pH). a uma densidade celular de 1,0 X 10^3 a 5,0 X 10^3 células por mL em Câmara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, EUA). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da nistatina e das micropartículas obtidas foi utilizado o método de micro diluição em caldo baseado no método de referência CLSI M27-A2.

Dessa forma, placas de 96 poços foram preenchidas com 100 µL da suspensão celular e 100 µL de solução padrão de nistatina ou diluições seriadas das micropartículas obtidas (EN10, EN20, EGN20) em DMSO e RPMI 1640. Após 24 h de incubação a 35°C em estufa, foi adicionado 30 µL de solução de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, USA) aos orifícios e foi realizada a leitura das microplacas num espectrofotômetro (EL800, Biotek, BioTek Instruments, EUA) na absorbância de 570 nm. Foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM) a concentração que inibiu 50% de crescimento.

Resultados e Discussão

Previamente à realização do experimento, foi realizada curva de crescimento para verificar o padrão de crescimento das culturas de *Candida albicans* em ambiente laboratorial.

Os dados referentes às concentrações inibitórias mínimas (CIM) das diferentes micropartículas poliméricas testadas sobre culturas de *C. albicans* podem ser observados na Figura 1 (concentrações versus densidade óptica).

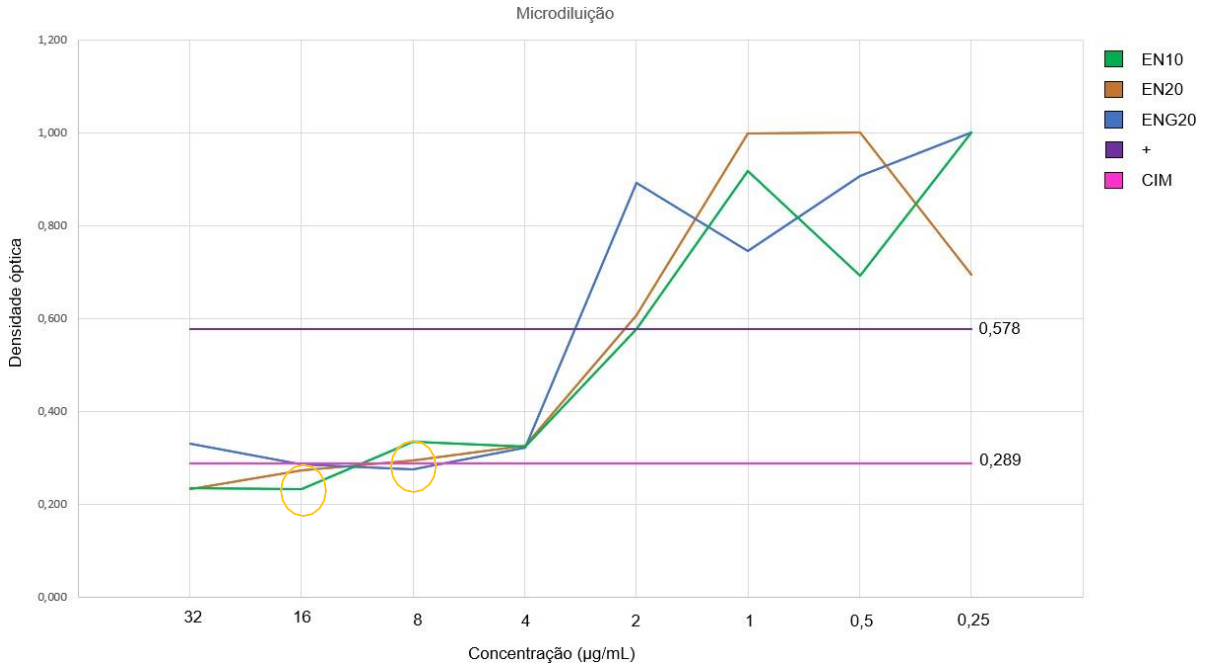


Figura 1. Resultados de densidade óptica (DO) das culturas de *C. albicans* em função da concentração teórica de nistatina nas micropartículas poliméricas EN10, EN20 e EGN20. Fonte: o próprio autor.

Analisando o gráfico presente na figura, podemos sugerir que a CIM tanto de EN20 quanto de EGN20 foi equivalente a 8 µg de nistatina por mL de solvente (RPMI 1640 e DSMO). Além disso, notamos que para a micropartícula EN10 foi necessário o dobro da concentração (16 µg/mL) para obter a mesma eficácia. Embora a eficiência de encapsulação demonstre que as micropartículas EN10 e EGN20 possuam incorporação semelhante de nistatina, o resultado diferente sugere que a presença de G na formulação EGN20 teve alguma influência na disponibilidade de nistatina, pois o mesmo é solúvel em água, diferente do E cujo solvente é o álcool etílico a 96%. Ademais, as micropartículas EN20 e EGN20 apresentaram resultados semelhantes, sugerindo que a partir da concentração de 20% de nistatina, os demais componentes da micropartícula não interferem na disponibilidade do fármaco. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmação das dúvidas levantadas a partir deste estudo.

Conclusões

Após a realização da curva de crescimento pôde-se observar que o horário ideal de crescimento da cepa padrão de *Candida albicans* inoculadas em nosso ambiente laboratorial foi o de 24 h, corroborando com o método de referência CLSI M27-A2. Além disso, notou-se que à concentração de 8 µg/mL as micropartículas EN20 e EGN20 foram efetivas na redução de 50% do crescimento dessa cepa

padrão, tendo sido esta a CIM encontrada para essa micropartícula. Ademais, a micropartícula EN10 apresentou resultados de inibição semelhantes (redução de 50%) à concentração de 16 µg/mL, sendo essa sua CIM dentro das condições de realização do presente experimento. Assim, estas foram as concentrações eleitas para estudos mais aprofundados visando a aplicação na cavidade oral.

Obs: Os nomes dos polímeros E e G foram omitidos devido a solicitação de patente.

Agradecimentos

Ao CNPq por possibilitar auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

A UEPG por disponibilizar as instalações e equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

A minha orientadora Dra Nara Hellen Campanha Bombarda que sempre me incentivou durante a pesquisa.

A minha co-orientadora Cynthia Maria Schnekenberg Egg que esteve comigo durante os momentos mais difíceis e inusitados desta pesquisa.

Referências

BARBEAU, J. et al. Reassessing the presence of Candida albicans in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v. 95, n. 1, p. 51-59, jan. 2003.

CLSI 2002. M27-A2 NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada* - 2ª. Ed. **NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

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.

MELO C. S.; CUNHA JUNIOR A. S.; FIALHO S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 33, n. 4, p. 469-477, 2012.

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.

POLYZOIS, G.et al. Antimicrobial efficacy of denture adhesives on some oral malodor-related microbes. **Odontology**, v. 101, n. 1, p. 103-107, 2013.

RIBEIRO, J. L. **Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas contendo nistatina para adesivos protéticos**. 88 f. Dissertação de mestrado – UEPG. Ponta Grossa, 2018.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE R. L. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.