EFETIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MATERIAL CONDICIONADOR DE TECIDO MODIFICADO POR COMPLEXOS DE INCLUSÃO NISTATINA: E CLOREXIDINA:β-CICLODEXTRINA

Victoria Schlumberger Cachoeira (PIBIC/CNPq/UEPG), Francine Sumie Morikava, Gustavo Simão Moraes, Karin Hermana Neppelenbroek, Vanessa Migliorini Urban (Orientador), e-mail: vanurban@yahoo.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia

Odontologia/Materiais Odontológicos

Palavras-chave: antifúngicos, ciclodextrinas, condicionadores de tecido

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade antifúngica de complexos de inclusão (CI) nistatina: e clorexidina:β-ciclodextrina (Nis: e Clx:βCD) incorporados ao material condicionador de tecido Softone™. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) ao biofilme de *Candida albicans* dos CI Nis: e Clx:βCD obtidos por suspensão seguida por liofilização nas proporções molares 1:1 e 1:2, respectivamente, quando incorporados ao material por meio do ensaio espectrofotométrico por redução de sais de tetrazólio (XTT). As CIM foram definidas como as concentrações suficientes para inibir o crescimento fúngico ao longo do período de avaliação em valores maiores ou iguais a 90%. As análises foram realizadas durante o período de 14 dias. Para inibir ≥90% do crescimento fúngico, foi necessária a incorporação de 32 mg de Nis, 64 mg de Clx, 36 mg de Nis:βCD (equivalentes a 16,14 mg de Nis) e 46 mg de Clx:βCD (equivalentes a 8,36 mg de Clx) para cada 1 g de pó do material. Quando incorporados ao material, os fármacos complexados apresentaram melhor efetividade antifúngica que quando na forma pura.

Introdução

A candidose bucal é considerada a infecção fúngica mais frequente entre humanos e quando associada à utilização de próteses removíveis é denominada estomatite protética. Apesar de sua etiologia ser considerada multifatorial, a infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico (BANTING e HILL, 2001).

Mesmo quando a terapia antifúngica é instituída, tem sido comumente observado um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após o tratamento. Essa reincidência tem sido atribuída à concentração insuficiente dos fármacos sobre a superfície protética que mantém contato com os tecidos bucais, haja vista que ocorre a formação de um complexo biofilme microbiano em profundidade na resina acrílica (SATO *et al.*, 1997).

Materiais macios à base de resina acrílica têm sido utilizados como adjuntos no tratamento da mucosa bucal traumatizada. Para prolongar sua longevidade clínica, alguns autores têm proposto a incorporação de fármacos antimicrobianos nesses materiais (BUENO *et al.*, 2015). Essa combinação pode ser uma terapêutica lógica no tratamento da estomatite protética por vários fatores: redução do trauma

causado pela superfície interna de resina acrílica rígida das próteses removíveis; eliminação do contato da superfície contaminada com os tecidos bucais e, consequentemente, do ciclo de reinfecção e ação dos fármacos antimicrobianos incorporados ao material diretamente sobre os tecidos infectados (SCHNEID, 1992).

Por outro lado, a maioria dos fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento da estomatite protética é pouco solúvel em água. Neste contexto de problemas relacionados à solubilidade, liberação e absorção de fármacos pouco solúveis, uma estratégia tem sido a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CD) visando aumentar a estabilidade e otimizar a atividade antimicrobiana dos fármacos. Além do que uma formulação nanoestruturada poderia superar os problemas de solubilidade, criando um sistema de liberação controlada com excelente atividade antimicrobiana e poucos efeitos adversos (UEKAMA, 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade antifúngica de complexos de inclusão (CI) nistatina: e clorexidina:β-ciclodextrina (Nis: e Clx:βCD) incorporados ao material condicionador de tecido Softone™.

Materiais e Métodos

O material macio temporário selecionado para este estudo foi o condicionador de tecido Softone™ (Bosworth Company, Skokie, IL, EUA). Os fármacos antifúngicos selecionados para este estudo foram a Nis (Teor 6.800,99 UI/mg; Fagron, Embu, SP) e a Clx (99,9%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A ciclodextrina (CD) selecionada para este estudo foi a β-ciclodextrina (βCD) (>97%; Sigma Aldrich).

Suspensões de Nis:βCD e Clx:βCD nas proporções molares de 1:1 e 1:2, respectivamente, foram dissolvidas em solução de etanol/água destilada 50:50 (v/v), agitadas a 25ºC por 24 h, congeladas a -82ºC e, então, liofilizadas por 72 h.

Foi utilizada a cepa de *C. albicans* SC5314. Uma alçada da cepa descongelada foi semeada em meio de cultura YEPD Agar e permaneceu incubada a 37ºC durante 48 h. Então, uma colônia de *C. albicans* foi removida da placa, ressuspensa em 20 mL de caldo YEPD e mantida *overnight* a 37°C. Os tubos de Falcon foram centrifugados a 4.000 rpm a 4ºC por 15 min. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de PBS foram adicionados ao *pellet*. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex e então centrifugado nas mesmas condições. Esse processo repetiu-se mais uma vez e, ao *pellet* final obtido, foram adicionados 20 mL de PBS estéril (concentração final de 2,6 x 10^7 UFC/mL).

Cada corpo de prova (n=6; 10 x 1 mm), confeccionado de maneira asséptica em câmara de fluxo laminar, modificado ou não pela incorporação dos fármacos puros ou complexados foi colocado individualmente em um orifício de uma placa de 24 poços posicionado na horizontal por meio de dispositivos metálicos, sendo imerso em 2 mL de inóculo. As placas de cultura foram colocadas em incubadora a 75 rpm durante 90 min a 37°C (CHANDRA *et al.*, 2001). Os corpos de prova foram transferidos para outros poços contendo 2 mL de PBS. Finalmente, foram imersos em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose e MOPS, onde permaneceram para formação do biofilme por 7 ou 14 dias.

Os corpos de prova incubados foram transferidos para orifícios de uma placa de 24 poços contendo 2 mL da solução de XTT. As placas foram deixadas em agitador orbital a 75 rpm durante 3 h a 37°C. Uma alíquota de 1,6 mL da solução de cada poço foi removida e transferida para microtubos. Estes foram então submetidos à centrifugação a 10.000 rpm durante 2 min a 10ºC. O sobrenadante de cada

microtubo foi transferido para um orifício de uma placa de 96 poços para avaliação em espectrofotômetro a 550 nm (NCCLS, 2002).

Os grupos experimentais avaliados foram: Ct = Softone manipulado de acordo com as instruções do fabricante (Grupo controle); Soft+Nis = Softone modificado pela incorporação de Nis na sua CIM (32 mg/g do material) (BUENO *et al.*, 2015); Soft+Clx = Softone modificado pela incorporação de Clx na sua CIM (64 mg/g do material) (BUENO *et al.*, 2015); Soft+Nis:βCD = Softone modificado pela incorporação do CI Nis:βCD 1:1 Lio; Soft+Clx:βCD = Softone modificado pela incorporação do CI Clx:βCD 1:2 Lio.

Os dados obtidos foram convertidos em porcentagens de redução de crescimento fúngico de acordo com a Equação: % redução = (Abs controle – Abs experimental) x 100/Abs controle; na qual: *% redução* refere-se à porcentagem de redução da atividade fúngica, *Abs controle*, à absorbância a 550 nm do grupo controle e *Abs experimental*, à absorbância a 550 nm dos grupos experimentais do material modificado pela incorporação dos fármacos puros ou complexados em determinada concentração (NCCLS, 2002). As CIM foram definidas como as concentrações suficientes para inibir o crescimento fúngico ao longo do período de avaliação (14 dias) em valores maiores ou iguais a 90%.

Resultados e Discussão

Os resultados de inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans* em corpos de prova do material Softone™ modificados pela incorporação dos fármacos puros Nis ou Clx ou dos complexos de inclusão podem ser visualizados na Figura 1. Para inibir ≥90% do crescimento fúngico, foi necessária a incorporação de 32 mg de Nis, 64 mg de Clx, 36 mg de Nis:βCD (equivalentes a 16,14 mg de Nis) e 46 mg de Clx:βCD (equivalentes a 8,36 mg de Clx) para cada 1 g de pó do material.

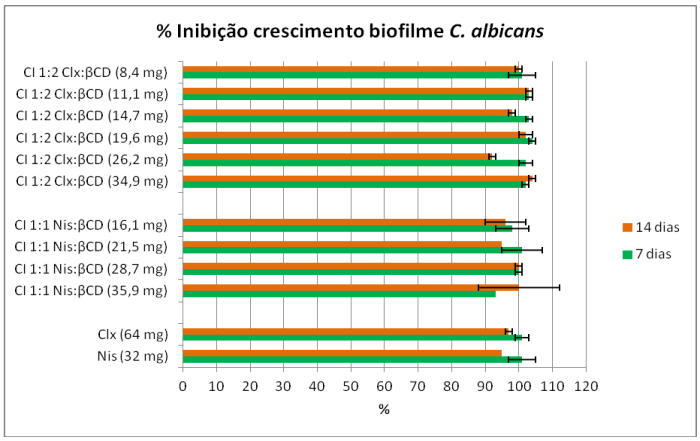


Figura 1 – Inibição do crescimento de *C. albicans* em porcentagem

A atividade antifúngica melhorada apresentada pelos complexos de inclusão com ciclodextrinas em relação aos fármacos não complexados está associada à maior solubilidade e estabilidade físico-química dos fármacos dentro dos complexos de inclusão e à sua difusão melhorada, uma vez que os fármacos são menos solúveis em água que os complexos (RASOOL e SALMO, 2012). Os valores mais baixos de concentrações inibitórias mínimas apresentados pelos complexos de inclusão foram atribuídos à supersaturação do meio de cultura com os antifúngicos liberados (MEMISOGLU *et al.*, 2003) devido à sua maior solubilidade (RASO *et al.*,

2010). Além disso, também foi verificado que a biodisponibilidade de um fármaco (clotrimazol) foi melhorada após sua inclusão na ciclodextrina (RASOOL e SALMO, 2012).

Pode ser inferido que a associação entre fármacos antifúngicos pobremente solúveis em água, como a nistatina e a clorexidina, e agentes carreadores oligossacarídeos como as ciclodextrinas pode resultar em estratégias interessantes para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, uma vez que necessitam ter comportamentos antagônicos; características lipofílica, para que penetrem e atuem sobre as membranas celulares fúngicas e hidrofílica, para que possam chegar até o alvo da infecção (RASOOL e SALMO, 2012).

Conclusões

Quando incorporados ao material condicionador de tecido, os fármacos nistatina e clorexidina complexados com a ciclodextrina apresentaram melhor efetividade na inibição ao crescimento de *C. albicans* do que os mesmos fármacos na sua forma pura não complexada durante 14 dias de avaliação.

Agradecimentos

Encerro agradecendo à Professora e Orientadora Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban, à minha co-orientadora Ms. Francine Sumie Morikava, ao meu co-orientador Ms. Gustavo Simão Moraes e ao PIBIC/CNPq/UEPG pela experiência e bolsa de iniciação cientifica que me foram concedidas.

Referências

BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist,** v. 21, n. 1, p. 4-8, 2001.

BUENO, M. et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the Candida albicans biofilm. **Oral Dis,** v. 21, n. 1, p. 57-65, Jan 2015.

CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res,** v. 80, n. 3, p. 903-908, Mar 2001.

MEMISOGLU, E. et al. Direct formation of nanospheres from amphiphilic beta-cyclodextrin inclusion complexes. **Pharm Res,** v. 20, n. 1, p. 117-125, Jan 2003.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS M27-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard**. 2nd. Wayne, Pa: 2002.

RASO, E. M. G. et al. A new controlled release system of chlorhexidine and chlorhexidine:βcd inclusion compounds based on porous silica. **J Incl Phenom Macrocycl Chem,** v. 67, n. 1, p. 159-168, Jun 2010.

RASOOL, B. K.; SALMO, H. M. Development and clinical evaluation of clotrimazole-beta-cyclodextrin eyedrops for the treatment of fungal keratitis. **AAPS PharmSciTech,** v. 13, n. 3, p. 883-889, Sep 2012.

SATO, M. et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. **Aust Dent J,** v. 42, n. 5, p. 343-346, Oct 1997.

SCHNEID, T. R. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. **Spec Care Dentist,** v. 12, n. 6, p. 245-250, Nov-Dec 1992.

UEKAMA, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. **Chem Pharm Bull,** v. 52, n. 8, p. 900-915, Aug 2004.