

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ANTIFÚNGICOS PUROS E COMPLEXADOS COM β -CICLODEXTRINA SOBRE *ARTEMIA SALINA*

Thaynara Aparecida Alves Pedroso (PROVIC/FA/UEPG), Nathaly Mayer Tozetto, Marcela Alves de Mattos, Gustavo Simão Moraes, Fábio André dos Santos, Karin Hermana Neppelenbroek, Vanessa Migliorini Urban (Orientadora), e-mail: thaynaraalvespedroso@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Setor de Ciências Biológicas e da Saúde/Ponta Grossa, PR.

Área de Odontologia e subárea de Materiais Odontológicos

Palavras-chave: Testes de Toxicidade, Clorexidina, Nistatina

Resumo

Este estudo avaliou a toxicidade de antifúngicos puros e complexados com β -ciclodextrina sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Para a eclosão dos ovos dos microcrustáceos, foi preparada uma solução salina na concentração de 36 g/L de sal marinho em água destilada, a qual foi mantida em agitação e a 25°C-35°C por 48 h. Soluções-mãe (1 mg/mL) dos fármacos clorexidina (Clx) e nistatina (Nis), em suas formas puras e complexadas com β -ciclodextrina (β CD), foram preparadas em metanol. Soluções de trabalho foram obtidas nas concentrações 125, 250, 375, 500, 750 e 1.000 μ g/mL. Como controle positivo, foi utilizado o sulfato de quinidina nas mesmas concentrações e, como controle negativo, apenas solução salina. Então, 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidos a cada tubo de ensaio com 5 mL de solução salina. A contagem de náuplios vivos e mortos foi realizada após 24 e 48 h. A análise de Probit foi utilizada para determinar a concentração letal (CL_{50}) de cada fármaco. Ambas as formas da Nis apresentaram CL_{50} acima de 1,5 mg/mL. As CL_{50} da Clx em suas formas pura e complexada com β CD foram muito inferiores às da Nis nos dois períodos de avaliação, indicando que a Clx é muito mais tóxica, porém sua forma complexada tem menor toxicidade.

Introdução

A estomatite protética é uma infecção oportunista que possui etiologia multifatorial (BANTING e HILL, 2001) e que tem como principal fator causal a infecção por *Candida albicans* (MARTINS e DE LACERDA GONTIJO, 2017). Outros fatores predisponentes incluem o trauma causado pelo uso de próteses desadaptadas, hipossalivação (BARBEAU et al., 2003), alteração do pH da saliva, má higiene bucal (LOMBARDI e BUDTZ-JORGENSEN, 1993), entre outros.

Dentre os tratamentos disponíveis, incluem-se melhoria na higiene bucal e das próteses, substituição, ajuste e/ou reembasamento das próteses, terapia antifúngica tópica e/ou sistêmica, interrupção do uso

noturno das próteses, laserterapia e terapia fotodinâmica (MIMA et al., 2012). No entanto, mesmo quando a terapia antifúngica é instituída, é comum observar um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas. Essa reincidência tem sido atribuída a fatores como concentração insuficiente dos fármacos sobre a superfície protética que mantém contato com os tecidos bucais e o uso contínuo das próteses desadaptadas e contaminadas (SATO et al., 1997).

Outra modalidade de tratamento que vem sendo estudada é a incorporação de fármacos antifúngicos, como a nistatina (Nis) e a clorexidina (Clx), em materiais condicionadores de tecidos e reembasadores resilientes (BUENO et al., 2015). Dentre os benefícios dessa terapia, podem-se citar a adaptação da prótese e redução do trauma à mucosa subjacente devido à utilização de material macio, o maior tempo de contato dos fármacos com os tecidos infectados e a independência da participação dos pacientes durante o tratamento (TRUHLAR et al., 1994). A incorporação de Nis e Clx nesses materiais mostrou-se efetiva na inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans* (BUENO et al., 2015) e não resultou em alterações clinicamente relevantes em suas propriedades físicas e mecânicas (URBAN et al., 2015; BUENO et al., 2017). No entanto, a fim de melhorar a liberação destes fármacos pouco solúveis, aumentar sua estabilidade físico-química, reduzir toxicidade e otimizar sua atividade antimicrobiana, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas tem sido proposta (DUCHÊNE e WOUESSIDJEWE, 2008).

Para comprovar a efetividade e segurança de novos tratamentos, testes laboratoriais e em animais devem ser realizados. Dentre os quais, pode-se citar o ensaio biológico utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, que é considerado um teste preliminar de avaliação de toxicidade e apresenta vantagens de rapidez de execução, praticidade, confiabilidade e custo reduzido (MEYER et al., 1982). Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos antifúngicos Nis e Clx puros e complexados com β -ciclodextrina sobre o microcrustáceo *Artemia salina*.

Materiais e métodos

Eclosão dos ovos

Primeiramente, foi necessário criar um ambiente favorável para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* (Maramar Aquacultura, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), o qual foi preparado adaptando a metodologia de Meyer e colaboradores (MEYER et al., 1982). Uma solução salina com água destilada e sal marinho foi preparada na concentração de 36 g/L. Previamente à colocação dos ovos, esta solução foi mantida aerada utilizando um compressor de ar durante 30 min. Além disso, foi utilizado um agitador magnético (QUIMIS, Joinville, SC, Brasil) para manter a solução em constante agitação até a eclosão dos ovos. O meio foi mantido em uma temperatura entre 25°C a 35°C, utilizando uma luminária com lâmpada incandescente. Após esse preparo, 200 mg de ovos foram colocados na solução, onde permaneceram por 48 h.

Ensaio de toxicidade

Para determinar a concentração letal (CL_{50}) da Nis (Fleming Manipulações Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR, Brasil) e Clx (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil), em suas formas puras e complexadas com β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich®), foram preparadas, inicialmente, soluções-mães de cada fármaco na concentração de 1 mg/mL. O mesmo foi feito para o sulfato de quinidina, que serviu como controle positivo.

Os fármacos foram solubilizados em 50 mL de metanol P.A. (F. Maia Ind. e Com. Ltda., Mogi das Cruzes, SP, Brasil) sob agitação magnética. Diferentes volumes dessas soluções-mãe foram pipetados e transferidos para tubos de ensaio, os quais foram mantidos em estufa a 50°C por 120 h para a evaporação do metanol. O conteúdo de cada tubo foi então ressuspenso em 5 mL de solução salina, obtendo soluções-filhas nas concentrações de 125 μ g/mL, 250 μ g/mL, 375 μ g/mL, 500 μ g/mL, 750 μ g/mL e 1.000 μ g/mL. Na sequência, dez náuplios de *Artemia salina* foram transferidos para cada tubo de ensaio. Os mesmos tiveram sua parte externa envolta por papel alumínio e foram mantidos fora da claridade da luz e em temperatura ambiente.

A contagem de náuplios vivos e mortos deu-se por sua motilidade e foi realizada após 24 h e 48 h, por meio da visualização a olho nu sob iluminação. Esse experimento foi realizado em triplicata e em três ocasiões diferentes.

Análise estatística

Para determinar a CL_{50} de cada fármaco, os dados foram tabulados em planilha Excel (Microsoft® Excel, 2016) e, então, analisados estatisticamente utilizando o software SPSS (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA) por meio da análise PROBIT pelo Método de Finney (StatPlus:mac Pro® Version 7, AnalystSoft Inc.; <http://www.analystsoft.com>) com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

A curva dose-resposta da sobrevivência em relação à concentração dos fármacos em 24 e 48 h é apresentada na Figura 1. A Nis e o complexo Nis: β CD apresentaram CL_{50} acima de 1,5 mg/mL, e foram muito menos tóxicos do que a Clx pura e complexada, as quais apresentaram CL_{50} abaixo de 0,5 mg/ml nos dois períodos de avaliação. A toxicidade da Clx já foi descrita por outros trabalhos, tanto in vitro quanto em animais e humanos, e o complexo Clx: β CD apresentou uma CL_{50} em 48 h bastante superior à sua forma pura, indicando ser menos tóxico.

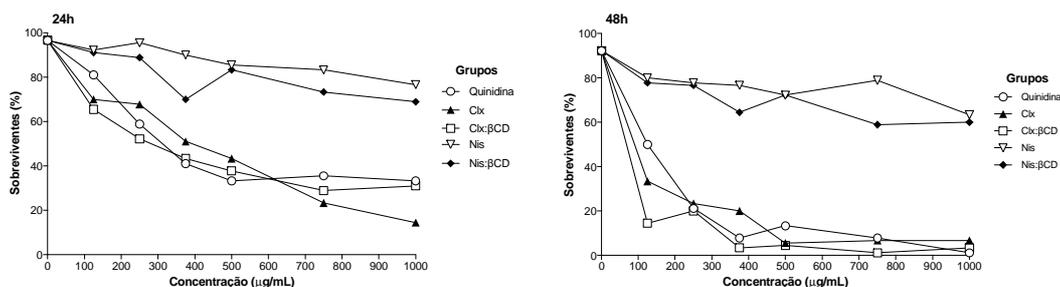


Figura 1 – Curvas dose-resposta da sobrevivência de *Artemia salina* aos diferentes fármacos para a determinação da concentração letal (CL₅₀) após 24 e 48 h.

Conclusões

Os grupos Nis e Nis:βCD apresentam menor toxicidade comparados à Clx e à Clx:βCD, sendo o grupo complexado ainda menos tóxico que sua forma pura.

Agradecimentos

Agradeço à minha professora e orientadora, Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban, ao meu coorientador Ms. Gustavo Simão Moraes, às minhas amigas do grupo de pesquisa Nathaly Mayer Tozetto e Marcela Alves de Mattos e à UEPG, pela oportunidade e por toda ajuda nesse trabalho.

Referências

- BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 21, n. 1, p. 4-8, 2001.
- BARBEAU, J. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 95, n. 1, p. 51-9, Jan 2003.
- BUENO, M. et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 57-65, Jan 2015.
- BUENO, M. G. et al. Surface Properties of Temporary Soft Liners Modified by Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungals. **Braz Dent J**, v. 28, n. 2, p. 158-164, Jan-Apr 2017.
- DUCHÈNE, D.; WOUESSIDJEW, D. **Pharmaceutical Uses of Cyclodextrins and Derivatives**. 2008.
- LOMBARDI, T.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. **Eur J Prosthodont Restor Dent**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 17-22, Sep 1993.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n. 5, p. 31-4, May 1982.
- MIMA, E. G. et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 10, p. E380-8, Oct 2012.
- SATO, M. et al. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. **Aust Dent J**, Sydney, v. 42, n. 5, p. 343-6, Oct 1997.
- TRUHLAR, M. R.; SHAY, K.; SOHNLE, P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 71, n. 5, p. 517-24, May 1994.
- URBAN, V. M. et al. Effect of the addition of antimicrobial agents on Shore A hardness and roughness of soft lining materials. **J Prosthodont**, v. 24, n. 3,

p. 207-14, Apr 2015.

URBAN, V. M. et al. Processo de obtenção e incorporação de complexos de inclusão fármaco ciclodextrina em material macio temporário no tratamento da estomatite protética. Patente BR 10 2019 007452 3, 2019.