

Dentifrício experimental contendo Nistatina: efeito antifúngico e características fisicoquímicas em um estudo in vitro

Experimental dentifrice containing Nystatin: antifungal effect and physicochemical characteristics in an in vitro study

Ellen Caroline Araújo da Silva Oliveira¹, Maria Thais Soares Macedo², Jocianelle Maria Félix Fernandes Nunes³, Fábio Correia Sampaio⁴, Isabela Albuquerque Passos Farias⁵

¹Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal da Paraíba; ²Doutora em Odontopediatria, Professora do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba; ³Doutorado em Cariologia, Professor do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba; ⁴Doutora em Biotecnologia em Saúde, Professora do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

Introdução: A candidíase oral é uma das mais frequentes infecções oportunistas da cavidade oral, representada pelo crescimento excessivo de *Candida albicans*, seguido por *Candida glabrata*. O protocolo de tratamento envolve terapia com antifúngicos e higiene oral. O dentifrício é um produto de uso rotineiro na clínica odontológica e na vida da população, incrementando a higiene mecânica e sendo veículo para agentes antifúngicos. Dentre esses, destaca-se a Nistatina (NIS), em suspensão oral, pela sua eficácia clínica e reduzido efeito adverso. **Objetivo:** Desenvolver e avaliar dentifrício experimental contendo Nistatina. **Metodologia:** Foi desenvolvido um dentifrício a partir de uma formulação base por adição de Nistatina em três concentrações. A atividade antifúngica foi avaliada pela Concentração inibitória mínima (CIM) e teste de difusão em ágar. Foram avaliadas as propriedades físicas do dentifrício. Os dados foram apresentados por média e aplicados o teste ANOVA e pós teste de Tukey. **Resultados:** O valor de CIM da Nistatina foi $0,05 \pm 0,017 \mu\text{g}/\text{mL}$. A atividade antifúngica apresentou valores de $17,3 \pm 3,93 \text{ mm}$, $20,40 \pm 8,08 \text{ mm}$ e $20,20 \pm 3,34 \text{ mm}$, para D1, D2 e D3, respectivamente ($p > 0,05$). Todas as formulações apresentaram capacidade espumante, porém D1 apresentou maior capacidade de formação de espuma (18,7%). As três formulações apresentaram capacidade de espalhamento aproximado a 7 cm. As formulações apresentaram capacidade de limpeza semelhante ao controle negativo. **Conclusão:** Os dentifrícios apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e exibiram propriedades físicas satisfatórias, sem influência negativa pela incorporação da Nistatina.

PALAVRAS-CHAVE: Antifúngicos. Cremes dentais. Nistatina.

ABSTRACT

Introduction: Oral candidiasis is one of the most frequent opportunistic infections of the oral cavity, represented by the excessive growth of *Candida albicans*, followed by *Candida glabrata*. The treatment protocol involves antifungal therapy and oral hygiene. Dentifrice is a product routinely used in dental clinics and the population's daily lives, improving mechanical hygiene and serving as a vehicle for antifungal agents. Among these, Nystatin (NIS) stands out for its clinical efficacy and reduced adverse effects in oral suspension. **Objective:** To develop and evaluate an experimental dentifrice containing Nystatin. **Methodology:** A dentifrice was created from a base formulation by adding Nystatin in three concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC) and agar diffusion test evaluated the antifungal activity. The physical properties of the dentifrice were assessed. Data were presented as means, and the ANOVA and Tukey's post-hoc tests were applied. **Results:** The MIC value of Nystatin was $0.05 \pm 0.017 \mu\text{g}/\text{mL}$. The antifungal activity showed values of $17.3 \pm 3.93 \text{ mm}$, $20.40 \pm 8.08 \text{ mm}$ and $20.20 \pm 3.34 \text{ mm}$, for D1, D2 and D3, respectively ($p > 0.05$). All formulations showed foaming capacity, but D1 showed the highest foaming capacity (18.7%). The three formulations showed a spreading capacity of approximately 7 cm. The formulations showed a cleaning capacity similar to the negative control. **Conclusion:** The dentifrices showed antifungal activity against *C. albicans* and exhibited satisfactory physical properties, with no negative influence by incorporating Nystatin.

KEYWORDS: Antifungals; Toothpaste; Nystatin.

INTRODUÇÃO

A cavidade oral é habitada por muitos microrganismos, dentre eles a *Candida albicans*, um fungo que, em condições específicas, pode originar diferentes doenças,

podendo variar de aftas pseudomembranosas agudas a formas mais crônicas, sendo a candidíase oral uma das infecções fúngicas mais encontradas^{1,2}.

Em 2021, o *Centers for Disease Control and Prevention Candida Infection*³ dos Estados Unidos publicou um guia clínico sobre candidíase de boca, garganta e esôfago. As recomendações envolvem a aplicação tópica de formulações como clotrimazol, miconazol e Nistatina (NIS) no tratamento de candidíase oral.

Corresponding / Correspondente: Isabela Albuquerque Passos Farias – Endereço: Av. Departamento de Odontologia Restauradora, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. Campus I, 58051-900, Castelo Branco, João Pessoa-PB. – E-mail: isabela.passos@academico.ufpb.br

A NIS em suspensão, de uso tópico, é a mais comum medicação antifúngica para candidíase oral⁴. Em geral, tem poucos e suaves efeitos adversos, porque sua absorção é limitada e não interage com outras drogas que o paciente esteja recebendo⁵. Sua absorção gastrointestinal é insignificante, com excreção inalterada pelas fezes, e seu protocolo de terapia exige a administração várias vezes ao dia e pelo menos 48 horas após sinais periorais desaparecerem².

Aliada à terapia medicamentosa, promover uma boa higiene oral é fundamental para prevenir infecções e tratar quando elas ocorrem⁵. Na rotina de higiene oral, a seleção de um dentífrico apropriado é essencial por seu papel relevante na desorganização do biofilme dentário por potencializar a escovação mecânica, podendo o dentífrico ser um veículo para agentes antimicrobianos atuantes na inibição do crescimento excessivo de *C. albicans*². Estudos *in vitro* apontam o desenvolvimento de dentífrico para candidíase contendo NIS em sistema livre, macro-, micro- e nanopartículas de alginato², o monoterpeno fenólico carvacrol⁶, bem como dentífricos herbais disponíveis no comércio¹.

O presente trabalho buscou uma alternativa ao tratamento de infecções fúngicas pelo desenvolvimento de um dentífrico contendo NIS visto que os dentífricos herbais e convencionais presentes no mercado apresentam atividade antimicrobiana semelhante¹. A literatura indica a eficácia do uso da NIS em suspensão na Candidíase oral^{3,4}.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de um dentífrico contendo NIS, bem como avaliar as suas propriedades físicas.

METODOLOGIA

Um estudo *in vitro* experimental foi conduzido. A análise laboratorial foi cega para concentração do dentífrico experimental.

Solução teste

A solução de Nistatina (NIS) 1mg/mL foi adquirida na farmácia de manipulação Dilecta, João Pessoa, Brasil.

Cepas bacterianas

Para o presente estudo, foi utilizada a cepa de *C. albicans* ATCC 76645. A cepa estava armazenada em caldo Sabouraud dextrose (SD; DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA) acrescido de 10% de glicerol à temperatura de -70 °C. A cepa fúngica foi crescida em meio SD por 24h a 37°C. Em seguida, foi centrifugada a 5000g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células foram resuspendidas com solução salina (0,9%) e padronizadas na escala de *McFarland* (1-5x10⁶ UFC/ mL) em espectrofotômetro a comprimento de onda de 530 nm⁷.

Concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) da Nistatina foi determinada pelo método de microdiluição em placa de

96 poços de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com modificações⁸. Duas filas de poços foram preparadas iniciando com NIS na maior concentração. Cada poço apresentou caldo do meio de cultura SD, antifúngico e inóculo padronizado (10%) em concentrações decrescentes das substâncias. A placa foi incubada em estufa microbiológica a 35°C por 24h. Após esse período, 35 µL do indicador de oxidação-redução resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) foi dispensado em cada poço. Os poços que mudaram a cor de azul para róseo, após 40 minutos de contato com o corante apresentaram crescimento microbiano. O valor da CIM foi definido no poço de menor concentração da substância testada que permanecer azul. O teste foi realizado em triplicata.

Dentífrico experimental

Após determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cepa de *C. albicans*, os dentífricos contendo NIS foram preparados em três concentrações: D1- CIM que correspondeu a 0,15 µg/mL de NIS; D2- CIMx2 que correspondeu a 0,3 µg/mL de NIS; e CIMx4, que correspondeu a 0,6 µg/mL.

Para preparação das três concentrações, foi conduzida agitação em vórtex da solução de NIS em uma formulação base de dentífrico comercial, sem flúor, infantil, My First® Colgate® Sem Flúor 0 a 2 Anos, Colgate-Palmolive Company, Estados Unidos. A formulação base foi o controle negativo (D4). Os frascos dos dentífricos foram etiquetados e codificados. O estudo foi cego para a concentração dos dentífricos.

Após preparação dos dentífricos experimentais contendo NIS, *slurries* foram preparados para os testes antimicrobianos por diluição de 10g de dentífrico em 10 mL de água destilada-deionizada, seguido por homogeneização⁹.

Difusão em ágar

O método de difusão em ágar foi conduzido com os dentífricos após padronização da cepa fúngica na escala 0,5 de *McFarland*. Orifícios de 8 mm foram realizados em placas de Petri contendo meio de cultura SD ágar. Trinta microlitros agentes foram dispensados em poços na placa de petri. As placas foram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente para pré-difusão antes da incubação a 35°C para mensuração do halo de inibição em milímetros após 48h¹⁰. Os testes foram realizados em triplicata. A sensibilidade da cepa fúngica ao dentífrico foi classificada de acordo com o diâmetro do halo de inibição como: não sensível (-) para diâmetro menor que 8 mm; sensível (+) para diâmetro entre 9–14 mm; muito sensível (++) para diâmetro entre 15-19 mm e extremamente sensível (+++) para diâmetro maiores que 20 mm¹¹.

Capacidade de limpeza

A capacidade de limpeza dos dentífricos foi investigada com a técnica do corante na casca de ovo pela

semelhança entre esta e o esmalte dentário com o cálcio sendo maior componente¹². Quinze mililitros de vinagre e 20 gotas de corante alimentar vermelho foram dispensados em 200 mL de água destilada a 100°C. Para cada formulação, um ovo cozido foi adicionado na solução corante por 5 min. Após esse período, foi realizada uma marcação para dividi-lo em duas porções no sentido longitudinal. Uma escova de dentes infantil (Oral B stages 1, Procter & Gamble, Brasil) úmida por água destilada, sacudida, com dentifrício formulado em quantidade de uma ervilha escovou um lado do ovo com 10 movimentos completos (para frente e para trás). O outro lado do ovo foi o controle negativo, e submetido a escovação da mesma maneira, com mesma pressão. Os ovos foram lavados e inspecionados quanto a remoção da cor¹³. A capacidade de limpeza dos dentifrícios foi interpretada como “+” capacidade de limpeza presente, “-” ausente¹².

Capacidade de espalhamento

Em uma placa de vidro, foi dispensado 1g da formulação de dentifrício. Uma segunda placa de vidro foi posicionada por cima da primeira, seguido por peso de 2 kg durante 10 min. Após remoção do peso, o diâmetro do dentifrício foi mensurado com paquímetro manual^{12,14}

Capacidade de formação de espuma

Para verificar a formação de espuma, 1 g de dentifrício foi dispensado em 15 mL de água destilada em um tubo graduado. Em seguida, o *slurry* foi mantido em repouso por 30 min, para permitir a dissipação da formulação na água, e então conduzido para vórtex por 1 min. O percentual da capacidade de formar espuma dos dentifrícios foi aferido pela altura da espuma acima da água dividido pela altura total¹².

Análise estatística

Os dados foram conduzidos para banco de dados informatizado, e analisados pela estatística descritiva (média, desvio-padrão), teste ANOVA e pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

A concentração inibitória mínima do dentifrício a base de Nistatina frente a *C. albicans* foi de $0,15 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

O dentifrício de Nistatina apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* nas três concentrações, sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A classificação da sensibilidade no método de difusão em poços revelou que o dentifrício D1 foi classificado como muito sensível (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição da média \pm desvio-padrão do halo de inibição da *C. albicans* de acordo com os dentifrícios contendo Nistatina em diferentes concentrações.

Dentifrício Cepa fúngica	Halo de inibição (mm)			
	D1 0,15 $\mu\text{g/mL}$	D2 0,3 $\mu\text{g/mL}$	D3 0,6 $\mu\text{g/mL}$	D4 Controle negativo
<i>C. albicans</i>	17,3 \pm 3,93 (++)	20,40 \pm 8,08 (+++)	20,20 \pm 3,34 (+++)	0 (NS)

ANOVA, pós teste de Tukey, $p > 0,05$;

Não sensível (NS); muito sensível (++); extremamente sensível (+++).

Em relação às propriedades físicas, todas as formulações apresentaram capacidade espumante, entretanto, D1 revelou maior capacidade de formação de espuma (18,7%) e D3 o menor valor (16,3%). A capacidade de espalhamento foi semelhante nas três formulações (apro-

ximadamente 7 cm), sendo observados valores maiores quando comparado ao controle (5,1 cm). As formulações apresentaram capacidade de limpeza semelhante ao controle negativo (Tabela 2).

Tabela 2 - Propriedades físicas do dentifrício experimental em diferentes concentrações de Nistatina.

	Dentifrícios experimentais contendo Nistatina			
	D1 0,15 mg/mL	D2 0,3 mg/mL	D3 0,6 mg/mL	D4 Controle negativo
Capacidade de formação de espuma (%)	18,7	18,3	16,3	18,0
Capacidade de espalhamento (cm)	7,2	7,5	7,4	5,1
Capacidade de limpeza	+	+	+	+

(+) Presente

DISCUSSÃO

A *C. albicans* presente em biofilmes está relacionada ao aparecimento da cárie dentária e da candidíase oral, uma infecção oportunista comum em indivíduos clinicamente comprometidos. Assim como os agentes antimicrobianos, os agentes antifúngicos podem ser utilizados em dentifrícios para inibir biofilme patogênico^{2,9}.

A incorporação do NIS por mistura simples ao dentifrício base evita esforços financeiros com elaboração biotecnológica de sistema de liberação e representa alternativa ao tratamento de candidíase oral.

De acordo com o valor apresentado na MIC, é possível observar que *C. albicans* apresentou alta sensibilidade à NIS, com valor mais baixo ao observado em sistema de NIS livre, macro-, micro- e nanoparticulada de alginato incorporado a dentifrício² e para dentifrício com carvacrol⁶.

A NIS incorporada no dentifrício base revelou eficácia contra cepa fúngica *in vitro* mostrando que a sua interação com componentes do dentifrício não influenciou na sua atividade antifúngica. Em contrapartida, em estudo anterior¹⁵, a *Punica granatum*, com reconhecida atividade antifúngica, foi ineficaz contra *C. albicans* em dentifrício herbal¹⁶. Em outro estudo¹, dentifrícios comerciais herbal e convencional apresentaram valores de halos de difusão inferiores aos do presente estudo.

Em relação ao tempo de tratamento, observou-se, em estudo prévio⁴, que uma semana de uso da suspensão de Nistatina oral é período para sucesso na eliminação de *C. albicans*. Entretanto, são necessários estudos clínicos para avaliar o tempo de ação da Nistatina no dentifrício.

Outros dados pesquisados referiram-se às propriedades físicas dos dentifrícios. Foi observado que, apesar da ausência do surfactante na formulação do dentifrício base, houve formação de espuma nos dentifrícios testados, assim a NIS incorporada ao dentifrício não influenciou a capacidade de formação de espuma. Resultado semelhante foi observado em estudo contendo componentes bioativos da goiabeira¹³. A espuma facilita o espalhamento do dentifrício por toda a cavidade oral durante a escovação, e configura-se como uma das propriedades preferidas dos consumidores na hora de escolher um creme dental. Além da capacidade espumante, os surfactantes facilitam o contato entre os ingredientes do creme dental e os dentes e mucosas através da redução da tensão superficial^{12,17}.

Entretanto, considerando que o dentifrício proposto no presente estudo é indicado para crianças muito pequenas (< 2 anos), o dentifrício base escolhido não apresenta o surfactante lauril sulfato de sódio. Ele apresenta efeitos adversos de reações alérgicas e tóxicas como dermatite e irritação de mucosas, principalmente, em pessoas propensas a aftas¹⁷.

A capacidade de espalhamento é entendida como uma medida da capacidade de penetração dos produtos em diferentes áreas após a aplicação^{12,17}. Não foi observada diferença nessa capacidade entre a formulação

base e as incorporadas com NIS. Resultados semelhantes foram observados em dentifrícios contendo extrato de plantas¹².

Baseando na mudança de coloração dos ovos pigmentados, todas as formulações apresentaram capacidade de limpeza das manchas. Dados semelhantes foram observados por Shaheena *et al.*¹³ (2019) ao avaliar o efeito abrasivo do pó de goiaba. É relevante salientar que a capacidade de limpeza foi satisfatória, e parece não sofrer influência da presença ou ausência do surfactante na formulação¹².

CONCLUSÕES

O dentifrício contendo Nistatina apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Os dentifrícios formulados exibiram propriedades físicas satisfatórias, sem influência negativa pela incorporação da Nistatina.

REFERÊNCIAS

1. Thounaojam N, Sanjenbam N, Pal S, Singh DK, Kumar K, Shah M. The Efficacy of Commercially Available Herbal Dentifrices in Comparison with Conventional Dentifrices against Two Common Oral Microbes: An In vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021;13(Suppl 1):S176-S179. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_635_20.
2. Pinto Reis C, Vasques Roque L, Baptista M, Rijo P. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. *Pharm Dev Technol.* 2016;21(3):282-7. doi: 10.3109/10837450.2014.999783.
3. Centers for Disease Control and Prevention Candida Infections of the Mouth, Throat, and Esophagus. [accessed on 30 January 2024]; Available online: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/thrush/index.html>.
4. Zhang L, Manning S, Wu TT, Zeng Y, Lee A, Wu Y, Paster BJ, Chen G, Fiscella K, Xiao J. Impact of Nystatin Oral Rinse on Salivary and Supragingival Microbial Community among Adults with Oral Candidiasis. *Microorganisms.* 2023;11(6):1497. doi: 10.3390/microorganisms11061497.
5. Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(2):e172-e180. doi: 10.4317/medoral.22978
6. Macêdo MTS, Oliveira ECAS, Nunes JMFF, Sampaio FC, Farias IAP. Actividad antifúngica y la caracterización física de un dentifrício experimental que contiene carvacrol. *Revista Cubana de Estomatología.* 2023; 60(2): e4618.
7. NCCLS (2002) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard. 4th Edition, NCCLS VET 08, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpccajpcgiclfefindmkaj/https://clsi.org/media/2321/vet08ed4_sample.pdf
8. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M27-A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2002. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpccajpcgiclfefindmkaj/https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf

9. Djais AA, Jemmy, Putri N, Rahmania Putri A, Angky Soekanto S. Description of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans* biofilms after exposure to propolis dentifrice by using OpenCFU method. *Saudi Dent J*. 2020 Mar;32(3):129-134. doi: 10.1016/j.sdentj.2019.08.003.
10. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. CLSI document M44-A2. 2nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://clsi.org/media/1634/m44a2_sample.pdf
11. Ponce AG, Valle CE, Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss Chard. *Lebensm Wiss Technol*. 2003; 679-784. doi: 10.1016/S0023-6438(03)00088-4
12. Ogboji J, Chindo IY, Jauro A, Borio DEA, Lawal NM. Formulation, physicochemical evaluation and antimicrobial activity of green toothpaste on *Streptococcus mutans*. *International Journal of Advanced Chemistry*. 2018;108-113. doi: 10.14419/ijac.v6i1.10808
13. Shaheena S, Chintagunta AD, Dirisala VR, Sampath Kumar NS. Extraction of bioactive compounds from *Psidium guajava* and their application in dentistry. *AMB Express*. 2019 Dec 28;9(1):208. doi: 10.1186/s13568-019-0935-x.
14. Shete DD, Patmas MA, Patil SP. Pro-Argin Technology Based Formulation of Eugenol Containing Toothpaste. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2020;323-328. doi:10.5530/ijper.54.2.37
15. Kumari I, Kaurav H, Chaudhary G. Ethnobotanical significance of *Picrorhiza Kurroa* (Kutki), a threatened species. *International Journal of Research and Review*. 2021; 8 (4): 363-375. doi: 10.52403/ijrr.20210443
16. Singh N, Nayyar A, Bhattacharjee G, Singh AK, Pruthi V. Assessment of dentifrices against *Candida* biofilm. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012 Jul;167(6):1688-98. doi: 10.1007/s12010-012-9574-2
17. Farias JM, Stamford TCM, Resende AHM, Aguiar JS, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;129:853-860. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.090

Submetido em: 03/11/2023

Aceito em: 22/01/2024