



ENXAGUATÓRIO BUCAL A BASE DE AMINOCHALCONA: EFICÁCIA ANTIMICROBIANA CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTANCIA MÉDICA E ODONTOLÓGICA.

Joice Graciani, Janaina de Cássia Orlandi Sardi, Emmanuely de Oliveira C. dos Santos, Mayara A. Rocha Garcia, Josy Goldoni Lazarini, Luís Octávio Regasini, Marlus Chorilli Luis Octávio Regasini, Suzana Gonçalves Carvalho, Pedro Luiz Rosalen.

Laboratório da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A microbiota residente bucal desempenha importante papel na resistência inespecífica do hospedeiro frente aos patógenos exógenos, entretanto a maior parte dos processos patológicos que afetam a cavidade oral apresenta algum agente infeccioso (Emeri et al., 2019). A microbiota pode contribuir para a patogenicidade de numerosas condições clínicas, como a cárie dental, estomatite, doenças periodontais, endodônticas e periapicais, entre outras (Bugno et al., 2006). Dessa forma seus constituintes comportam-se como anfíbios, isto é, microrganismos capazes de agredir o hospedeiro quando as condições ambientais e imunológicas são favoráveis, como se observa, por exemplo, em pacientes imunocomprometidos (Foschi et al., 2006). Entre esses microrganismos encontramos a *Candida albicans*, fungo comensal em humanos, que habita trato gastrointestinal, na mucosa oral e vaginal da maioria dos indivíduos saudáveis.

Além de fungos, mais de 700 espécies de bactérias foram identificadas e/ou previstas para habitar a cavidade oral (Ávila et al., 2009). Entre eles, muitas espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* foram descritas.

Os enxaguatórios bucais têm sido utilizados no controle químico de placa bacteriana com adjuntos aos procedimentos mecânicos, além de se constituírem em

facilitadores para a veiculação de compostos ativos para o tratamento de afecções específicas (McDonnell et al., 1999; Bugno et al., 2006).

Em geral, os antissépticos bucais não apresentam composição complexa; o diferencial neste tipo de produto é a sua eficácia antimicrobiana considerando os compostos ativos presentes, associados ou não a compostos de flúor (Nascimento et al., 2000). Os componentes ativos presentes nos anti-sépticos bucais rompem a parede celular e inibem a atividade enzimática da célula microbiana. Adicionalmente, previnem a agregação bacteriana e diminuem a multiplicação microbiana.

Assim, para haver a remoção do biofilme formado por estes microrganismos, é necessário associar métodos mecânicos e químicos. A remoção mecânica deve ser através da escovação e tendo como coadjuvante os enxaguatórios bucais. Os enxaguatórios bucais são a forma mais simples para veiculação de substâncias antissépticas, sendo uma mistura de componente ativo (antimicrobiano), água, álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes (Winkel et al., 2003; Ramos et al., 2012). Os agentes químicos para higienização bucal, além de servirem como veículo aos agentes terapêuticos, também devem colaborar para remoção de manchas e controle da halitose. Estudos prévios realizados por esse grupo de pesquisa têm demonstrado que as chalconas apresentam ação antimicrobiana potente contra patógenos orais com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando 7.8 a 15.6 µg/ml. Desta forma, esse projeto teve como objetivo estudar novo enxaguatório bucal preparado à base de uma aminochalcona contra patógenos de importância médica e odontológica utilizando corpos de prova de hidroxiapatita na presença de biofilmes mistos de *C.albicans* e *E. faecalis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As cepas utilizadas nesse estudo são cepas de referência advindas da ATCC, *C. albicans* MYA 2876 e *E. faecalis* ATCC 29212. *C. albicans* e *E. faecalis* foram congeladas a -20° C e reativadas e cultivadas em ágar BHIA (Brain Heart Infusion Agar) a temperatura 37°C em estufa



por 24 horas, a partir dessas culturas foram preparados os inóculos em salina 0,85 % estéril, sendo preparados em concentração de $2,5$ a 5×10^5 UFC/mL para bactérias e $,5$ a 5×10^3 UFC/mL para leveduras.

Foram realizados os experimentos da Concentração Inibitória Mínima (CIM), da Concentração Fungicida Mínima e Concentração Bactericida Mínima (CFM/CBM) das cepas de *C. albicans* e *E. faecalis*, *S. mutans*, MRSA e *S. aureus*. Os ensaios de sensibilidade das cepas de *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. mutans*, e *S. aureus* foram realizados frente a 30 chalconas sintetizadas pelo grupo do Prof. Luís Octávio Regasini do Laboratório de Química Verde e Medicinal (IBILCE - UNESP). Os controles para a determinação da CIM foram os antimicrobianos recomendados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). A partir dos resultados da CIM foi possível escolher o composto com melhor atividade e o mesmo foi elaborado em uma formulação (enxaguatório bucal) desenvolvido em colaboração no laboratório de farmacotécnica do Prof. Dr. Marlus Chorili (UNESP- Araraquara). A viabilidade celular foi avaliada através da Contagem de UFC/mL em biofilmes mono-espécies e misto de *C. albicans* e *E. faecalis* formados sobre discos de hidroxiapatita e tratados com I-38 e tratados durante três dias, 1 vez ao dia, por um minuto com as concentrações de 10x CIM da I-38, como controle positivo foi utilizado o Digluconato de Clorexidina 0,12% e como controle negativo o meio de cultura (saliva artificial) (André et al., 2017). Os horários de tratamento foram definidos a partir da premissa de que muitos pacientes fazem a higienização dental primordialmente antes de dormir. O biofilme de *C. albicans* e *E. faecalis* foi formado em discos de hidroxiapatita (1,25 cm de diâmetro, área de superfície de 2.7 ± 0.2 cm², Clarkson Chromatography Products, Inc., South Williamsport, PA) previamente esterilizado suspenso horizontalmente em placas de 24 poços. Uma alíquota de 1000µl da suspensão de células padronizadas (1×10^7 de *C. albicans* e *E. faecalis*) foi adicionado aos poços contendo os corpos de prova para a formação de biofilmes. Para a formação do biofilme misto, 500µl de cada suspensão (2×10^7 de *C. albicans* e *E. faecalis*) foram colocados nos poços para

a formação do biofilme. As placas foram incubadas estatisticamente em 5% de CO₂ a 37° C durante 24h para promover adesão celular. Em seguida, cada poço foi lavado por imersão uma vez com 500µl de salina para remover células não aderentes. A partir das 24h de formação do biofilme, o meio foi trocado e os biofilmes foram tratados uma vez ao dia por 60 segundos até o final do período experimental (72h) com intervalos de 24h com o enxaguatório a base de aminochalcona e comerciais usados como controles. Após os 60 segundos de exposição, os corpos de prova foram colocados em uma placa de 24 poços contendo um meio novo (André et al., 2017).

Para a determinação da toxicidade *in vivo* foi utilizado o modelo invertebrado da *Galleria mellonella* para avaliar os efeitos tóxicos agudos do enxaguatório a base de aminochalcona, como descrito por Megaw et al., 2015. Este modelo invertebrado permite a avaliação preliminar da toxicidade sistêmica mediante tratamento com um determinado medicamento (Megaw et al., 2015; Rochelle et al., 2016; Freires et al., 2017; Sardi et al., 2017). Para o experimento, utilizou-se 10 larvas selecionadas aleatoriamente para 6 grupos (DMSO 100%, grupo controle-salina 0,9%, Digluconato de Clorexidina 0,12%, enxaguatório, aminochalcona I-38 1x e enxaguatório a base de aminochalcona), pesando entre 0,2 e 0,3 g, sem ou com poucos sinais de melanização. Cinco microlitros da aminochalcona (200µg/mL) foram injetados no hemocele de cada larva através da última proleg esquerda utilizando uma seringa de Hamilton (Hamilton, Reno, NV). As larvas foram incubadas a 37° C e a sua sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados durante 72 h. As larvas que não exibiram movimento ao toque e com altos níveis de melanização foram contadas como mortas (Rochelle et al., 2016; Freires et al., 2017; Sardi et al., 2017).

E para determinação da toxicidade *in vitro* foi utilizado células FGH (Fibroblasto Gengival Humano) as quais foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. A aminochalcona I-38 foi avaliada quanto a citotoxicidade, para



isso, placas de 96 poços com as células, contendo 5×10^4 células/ poço foram preparadas. As células utilizadas foram as linhagens de fibroblasto gengivais humano (FGH) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). As placas foram incubadas a $36,5^\circ\text{C}$ com 5% de CO_2 , por 24 h para a formação da monocamada celular (Husoy et al.,1993). As substâncias foram deixadas em contato com a célula por 1 minuto que é o tempo em que o enxaguatório fica em contato com as células da cavidade bucal. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio do MTT (3-4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma), utilizado na concentração de 5mg/mL. (Denizot et al., 1986; Gerlier et al., 1986; Ferrari et al., 1990, Zarai et al., 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação do efeito da I-38 sobre a viabilidade celular através da Contagem de UFC/mL

A tabela 1 expressa os valores de MIC/MFC/MBC das amostras de chalcona contra *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *S. aureus*.

Tabela 1. Valores da Concentração Inibitória mínima das amostras de chalconas associadas ou não ao enxaguatório contra *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *S. aureus*.

Microrganismo/ CIM	Chalcona	Chalcona enxaguatório
<i>Candida albicans</i>	15,6	15,6
<i>Enterococcus faecalis</i>	7,8	7,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,9	3,9
<i>Streptococcus mutans</i>	15,6	15,6

Os biofilmes de *C. albicans* (A) e *E. faecalis* (B), após o plaqueamento, tiveram seus resultados expressos na figura 1. No biofilme de *C. albicans* (A), a utilização de 10x a CIM da substância I-38 associada ao enxaguatório obteve estatisticamente o mesmo resultado usando Digluconato de Clorexidina 0,12% quando comparado ao controle. Analisando os resultados obtidos após o plaqueamento do biofilme da *E. faecalis* (B) observa-se que a utilização de 10x

CIM também foi capaz de diminuir a quantidade de microrganismos quando comparado ao controle. Quando utilizado o veículo do enxaguatório não houve ação contra as *C. albicans* e *E. faecalis*, o que era de se esperar já que o mesmo deve ser inerte.

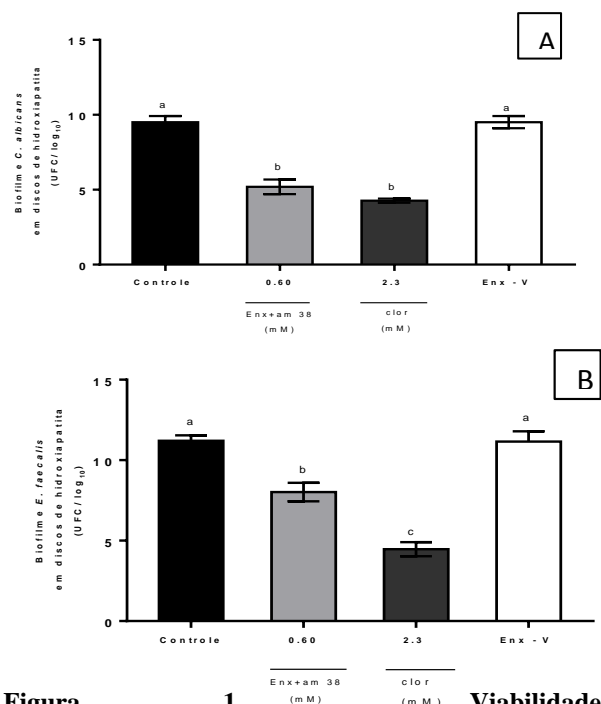


Figura 1. Viabilidade de biofilmes em formação de *C. albicans* (A) e *E. faecalis* (B) tratados com a I-38 (10X MIC), Digluconato de Clorexidina 0,12% e com enxaguatório sem associação a nenhum composto. Os resultados foram dados por UFC/ml (\log_{10}) Os dados foram comparados ao grupo tratado com o veículo onde $p < 0.05$ – One-way ANOVA com Post test de Tukey.

Na figura 2, podem-se avaliar os resultados do biofilme misto de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* após o plaqueamento e para ambos a utilização do enxaguatório associado a 10x o MIC da I-38 houve diminuição da quantidade de microrganismos quando comparado ao controle e ao enxaguatório sem associação a nenhuma substância. Para *C. albicans* houve diminuição de aproximadamente 7 logs e para *E. faecalis* 4 logs quando comparados ao biofilme sem tratamento.

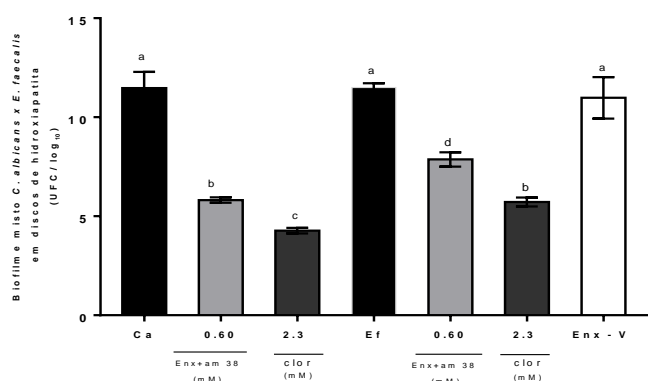


Figura 2. Viabilidade de biofilmes misto de *C. albicans* (Ca), *E. faecalis* (Ef) tratados com a I-38 10X MIC), Digluconato de Clorexidina 0,12% e com enxaguatório sem associação a nenhum composto. Os resultados foram dados por UCF/ml (\log_{10}) Os dados foram comparados ao grupo tratado com o veículo onde $p < 0.05$ – One-way ANOVA com Post test de Tukey.

3.2 Determinação da toxicidade *in vivo* usando o modelo invertebrado da *Galleria mellonella*.

Na figura 3 pode-se avaliar a toxicidade aguda sistêmica do composto em larvas de *Galleria mellonella*, na qual o enxaguatório a base de aminochalcona I-38 na concentração utilizada no antibiofilme (correspondendo à concentração de 156 $\mu\text{L}/\text{ml}$) não demonstrou efeitos tóxicos agudos até 72h de avaliação, assim como os grupos controle (grupo controle-salina 0,9%, Digluconato de Clorexidina 0,12%, enxaguatório e aminochalcona I-38).

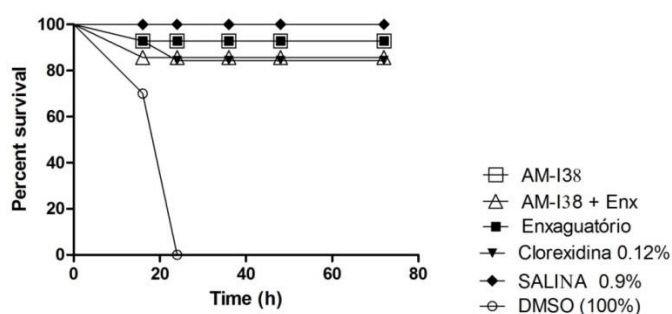
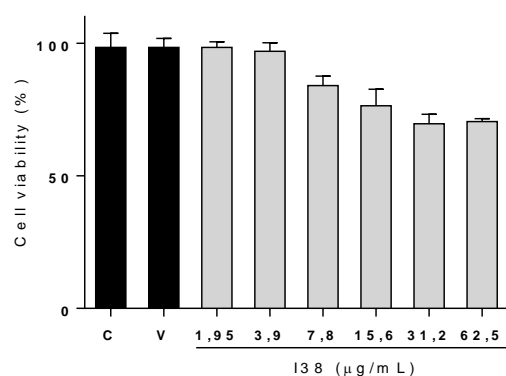


Figura 3. Toxicidade sistêmica *in vivo* do composto I-38 em larvas de *G. mellonella*.

3.3 Determinação da toxicidade *in vitro* usando fibroblasto gengival humano (FGH).

Na figura 4 pode-se avaliar a toxicidade *in vitro* do composto em células FGH (Fibroblasto Gengival Humano). As três concentrações mais altas reduziram em torno de 30% a viabilidade das células, entretanto o ensaio *in vitro* não é uma representação completa da resposta de um animal vivo à um medicamento, mas tem como objetivo gerar hipóteses para que pesquisadores possam continuar avançando na identificação de terapias eficazes.

Figura 4. Toxicidade *in vitro* do composto I-38 em células



FGH.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na pesquisa anterior a I-38 apresentou eficaz atividade antimicrobiana, sendo ativa contra biofilmes mono e multi-espécies de *C. albicans* e *E. faecalis*, reduzindo significativamente os microrganismos em ambas as condições, além de desempenhar boa ação contra a adesão celular e *in vitro* destes microrganismos. Aliado a estes resultados, a determinação da toxicidade e *in vivo* usando o modelo invertebrado *Galleria mellonella* demonstrou o potencial que a I-38 apresenta contra biofilmes de *C. albicans*, *E. faecalis* e misto, sem apresentar toxicidade *in vivo* sobre este modelo invertebrado, somado ao fato que ao serem tratadas com este composto aumenta-se as taxas de sobrevivência das larvas inoculadas com estes microrganismos.

Prosseguindo com a pesquisa, associada ao enxaguatório bucal a I-38 apresentou eficaz atividade antimicrobiana contra multi-espécies de *C. albicans* e *E. faecalis* na desinfecção dos discos de hidroxiapatita,



reduzindo significativamente os microrganismos. Assim como, na determinação da toxicidade *in vivo* usando o modelo invertebrado *Galleria mellonella* demonstrou o potencial que a I-38 apresenta contra biofilmes de *C. albicans*, *E. faecalis* e misto, sem apresentar toxicidade *in vivo* sobre este modelo invertebrado

5. BIBLIOGRAFIA

- André CB, Rosalen PL, Galvão LCC, Fronza BM, Ambrosano GMB, Ferracane JL, Giannini M. Modulation of *Streptococcus mutans* virulence by dental adhesives containing anti-caries agents. *Dent Mater.* 2017; 33:1084-1092.
- Arnaud RR, Sorares MSM, Santos MGC, Santos RC. Estomatite Protética: Prevalência e Correlação Com Idade e Gênero. 2012 Fev; 26.
- Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009;
- Bugno, A et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 65(1):40-45, 2006.
- Budtz-Jørgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *JAm Dent Assoc.* 1978 Mar.
- CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: norma aprovada. Brasília, DF, CLSI Documento M27A2 volume 22, p.1-51, 2008.
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986 May 22;89(2):271-7.
- Emeri FTAS, Rosalen PL, Paganini ÉR, Garcia MAR, Nazaré AC, Lazarini JG, Alencar SM, Regasini LO, Sardi JCO. Antimicrobial activity of nitrochalcone and pentyl caffeate against hospital pathogens results in decreased microb adhesion and biofilm formation. *Biofouling.* 2019 Apr 5:1-14.
- Sardi JCO, Polaquini CR, Freires IA, Galvão LCC, Lazarini JG, Torrezan GS, Regasini LO, Rosalen PL. Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. *J Med Microbiol.* 2017 Jun;66(6):816-824.
- Falcão AFP, Santos LB, Sampaio NM. Candidíase associada a próteses dentárias. 2004. Batista JM, Birman EG, Cury AE, Suscebibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. 1999 dez.
- Foschi F, Izard J, Sasaki H, Sambri V, Prati C, Müller R, Stashenko P. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *J Dent Res.* 2006 Aug;85(8):761-5.
- Gow NAR, Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology.* 2017 Aug 15.
- Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effects of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. *Eur J Orthod.* 2004;26:623-9.
- Hobson DW; Bolsen K. Methods of testing oral and topical antiseptics and antimicrobial. In: Block SS. *Desinfection, Sterilization and Preservation.* 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1329-59.
- Megaw J, Thompson TP, Lafferty RA, Gilmore BF. *Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere.* 2015 Nov; 139:197-201.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31: 247-56.
- Paganine ER. Síntese e atividade anti-HCV, anti-*Candida* e antibacteriana de nitrochalconas. 2016 Mar; 11.
- Pegoraro J, Silvestri L, Cara G, Stefenon L, Mozzini CA. Efeitos adversos do gluconato de clorixidina à 0,12%. 2014 set.
- Paganine ER. Síntese e atividade anti-HCV, anti-*Candida* e antibacteriana de nitrochalconas. 2016 Mar; 03.