



## Estudo de aminochalcona associada a hidrogel na desinfecção de resinas acrílicas com biofilmes de espécies de *Candida*.

Emmanuely de Oliveira Chaves dos Santos, Janaina de Cássia Orlandi Sardi, Joice Graciani, Mayara A. Rocha Garcia, Josy Goldoni Lazarini, Luís Octávio Regasini, Rafael Leonardo Xediek Consani, Suzana Gonçalves Carvalho, Marlus Chorilli e Pedro Luiz Rosalen.

### 1. Introdução

A estomatite protética é uma das candidoses mais frequentes na mucosa oral, presente em até 60% dos usuários de próteses (Webb et. al., 1998), caracterizada como uma lesão eritematosa presente no palato duro. Devido a diversos fatores, como xerostomia, pobre higienização da peça protética, tabaco, entre outros, o acúmulo de microrganismos na prótese é facilitado e estimula uma reação inflamatória local, observada como eritema e hiperplasia (Hannah et. al., 2017). Dentre estes microrganismos, espécies do gênero *Candida* estão presentes em 100% dos casos e destes, 70% corresponde à *Candida albicans* (Falcão et. al., 2004), um fungo oportunista que tem como um dos seus fatores patogênicos o dimorfismo celular, isto é, a capacidade de transição da estrutura morfológica de leveduras à hifas e a capacidade de formar biofilme. Embora seja abnóxia em indivíduos saudáveis, alterações ambientais como mudança do pH e do nível de oxigênio, uso de antibióticos e problemas que levam à imunossupressão acarretam em uma super proliferação da *C.albicans* o que desencadeia infecções locais ou sistêmicas (Lohse et. al., 2018). *Candida tropicalis* também possui a capacidade de formar biofilme e mesmo na sua forma planctônica apresenta diversos fatores de virulência como a alta habilidade de crescimento em hifa e a formação de gás por conta da elevada atividade metabólica (Kawai et. al., 2016).

O hipoclorito de sódio é a substância mais utilizada para a higienização de próteses por ser eficaz e não abrasivo (Arruda et. al., 2016), porém é sabido que tal substância pode provocar a degradação de componentes da resina acrílica, levando a mudanças de cores e aumento da rugosidade de superfície da peça protética dependendo da concentração utilizada (Porta, et. al., 2013).

O hidrogel é uma rede polimérica tridimensional (Sharpe et. al., 2014) que pode ser empregado isoladamente ou em associação com outras substâncias (Rogerio et. al., 2002) que possui um ótimo potencial terapêutico nas suas aplicações bucais por conta da sua biocompatibilidade, diversidade e propriedades ajustáveis (Sharpe et. al., 2014), dentre elas a capacidade de liberar gradativamente moléculas terapêuticas.

As chalconas são cetonas aromáticas pertencentes a classe dos flavonoides de cadeia aberta (Ferreira, et. al., 2018) encontrada em vegetais, frutas, chás e outras plantas (Zhuang, et. al., 2017). Tal composto possui comprovados efeitos terapêuticos como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética, antioxidante e efeitos neuroprotetores (Gomes, M. et. al., 2017). As chalconas demonstraram também efeitos antifúngicos sinérgicos contra a *C.albicans* (Wang, Y.-H., et. al., 2016). Estudos recentes realizados pela aluna demonstraram aumento da potência da chalcona após a modificação química com a adição de um grupo amino (dados não publicados). Desta forma, dando continuidade ao projeto anterior, foi estudada essa aminochalcona associada a hidrogel para desinfecção de próteses dentárias utilizando corpos de prova de resina acrílica na presença de biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. tropicalis*.



## 2. Materiais e Métodos

As cepas utilizadas nesse estudo são cepas de referência advindas da ATCC, *C. albicans* MYA 2876 e *C. tropicalis* ATCC 750, ambas foram congeladas a  $-20^{\circ}$ , reativadas e cultivadas em ágar BHIA (Brain Heart Infusion Agar) a temperatura  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa por 24 horas, a partir dessas culturas foram preparados os inóculos em salina 0,9 % estéril, sendo preparados em concentração de 2,5 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL.

A amino-chalcona I-35 foi sintetizada em colaboração pelo Grupo do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini do IBILCE de São José do Rio Preto (UNESP). O preparo do hidrogel associado a aminochalcona foi realizado em colaboração com prof. Dr. Marlus Chorilli no laboratório de farmacotécnica da UNESP de Araraquara. O preparo dos corpos de prova de resina acrílica foi realizado em colaboração com o prof. Dr. Rafael Consani da área de prótese total da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

De Agosto/2019 a Agosto/2020, foram realizados os experimentos da Concentração Inibitória Mínima (CIM), da Concentração Fungicida Mínima (CFM) das cepas *C. albicans* ATCC MYA 2876 e *C. tropicalis* ATCC 750. A partir dos resultados da CIM foi possível escolher o composto com melhor atividade e o mesmo foi elaborado em formulação (hidrogel) em colaboração no Laboratório de Farmacotécnica do professor Dr. Marlus Chorilli (Unesp- Araraquara). Foram realizados os experimentos da avaliação da viabilidade celular através da Contagem de UFC/mL em biofilmes mono-espécies e misto de *C. albicans* e *C. tropicalis* formados sobre corpos de prova de resina e tratados com I-35, tendo como controle positivo o hipoclorito de sódio.

Os ensaios de sensibilidade das cepas de *C. albicans* ATCC MYA 2876 e *C. tropicalis* (ATCC 750) 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). Estes ensaios foram realizados segundo o documento M27A2 (2008) do CLSI com algumas adaptações.

A viabilidade celular foi avaliada através da Contagem de UFC/mL de biofilmes mono-espécies e misto de *C. albicans* e *C. tropicalis* formados sobre os corpos de prova de resina (André et al. 2017) e tratados durante três dias, 1 vez ao dia (16h), por 10 minutos com a concentração de 5x CIM da I35 ( $7,8 \mu\text{g/mL}$ ); como controle positivo foi utilizado hipoclorito de sódio 0,2% (Bastos et al. 2015) e como controle negativo o meio de cultura (saliva artificial). Os horários de tratamento foram definidos a partir da premissa de que muitos pacientes fazem a higienização da peça protética uma vez ao dia ao final da tarde/noite.

Os biofilmes de *C. albicans* MYA 2876 e *C. tropicalis* ATCC 750 foram formados em corpos de prova de resinas acrílicas em placas de 12 poços. Uma alíquota de 1500  $\mu\text{l}$  da suspensão de células padronizadas ( $1 \times 10^7$  de *C. albicans* e *C. tropicalis*) foram adicionados aos poços contendo os corpos de prova para formação de biofilmes. Para a formação de biofilme misto, 750  $\mu\text{l}$  de cada suspensão ( $2 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  de *C. albicans* e de *C. tropicalis*) foi colocada nos poços. As placas foram incubadas estaticamente em estufa bacteriológica (aerobiose) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h para promover adesão celular. Em seguida, cada poço foi lavado uma vez com 500  $\mu\text{l}$  de salina para remover as células não aderentes. A aminochalcona associada ao hidrogel foi diluída de forma a obter a concentração de 5x o valor da CIM. Esta concentração foi baseada nos resultados da CIM, realizada durante o estágio da aluna Emmanuely de Oliveira no laboratório de Farmacologia da FOP/UNICAMP. A partir das 24h de formação do biofilme, o meio foi trocado e os biofilmes foram tratados uma vez ao dia por 10 minutos até o final do período experimental (72h) com um intervalo de tempo de 24h entre os tratamentos com o hidrogel a base de aminochalcona e com os comerciais utilizados como controle. Durante os tratamentos, os corpos de prova de resina com o biofilme foram removidos da placa de 12 poços e lavados por imersão em solução salina e depois transferidos para uma nova placa contendo as soluções com tratamento. Após os 10 minutos de exposição, os corpos de prova foram colocados em uma placa de 12 poços contendo um meio novo (Andre et al., 2017). Como controle positivo foi utilizado o Hipoclorito de Sódio 0,2% (Bastos et al., 2015) enquanto os poços inoculados apenas com meio de cultura foi o controle negativo. Todos os ensaios foram realizados de forma independente e em triplicata (Fernandes et al, 2016).



A determinação da toxicidade *in vivo* usando o modelo invertebrado da *Galleria mellonella* foi realizada para avaliar os efeitos tóxicos agudos da I-35 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 5 grupos (grupos controle-salina 0,9%, DMSO, I-35 5x, hidrogel e hipoclorito de sódio 0,2%), pesando entre 0,2 e 0,3 g, sem ou com poucos sinais de melanização. Cinco microlitros da amino-chalcona (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 96 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* foram utilizadas 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% CO<sup>2</sup>.

A aminochalcona I35 foi avaliada quanto a citotoxicidade, associada aos sistemas de liberação, para isso, placas de 96 poços com as células, contendo 5 x 10<sup>4</sup> 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°C com 5% de CO<sup>2</sup>, por 24 horas para a formação da monocamada celular (Husoy et al., 1993). 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-35 sobre a viabilidade celular através da Contagem de UFC/mL

Na tabela 1, podem-se avaliar os valores de MIC/MFC da aminochalcona I35 contra *C.albicans* e *C.tropicalis*. Esta que foi a selecionada para ser associada ao hidrogel e testada contra o biofilme mono e misto de ambos os microrganismos formados em corpos de prova de resina acrílica.

**Tabela1. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) chalcona I35 contra *C.albicans* e *C.tropicalis***

CIM	Chalcona	Chalcona + sistema
<i>Candida albicans</i>	7,8	7,8
<i>Candida tropicalis</i>	3,9	3,9

Os biofilmes de *C.albicans* (A) e *C.tropicalis* (B), após o plaqueamento, tiveram seus resultados expressos na figura 1.

No biofilme de *C. albicans* (A), a utilização de 5x a CIM da substância I-35 associada ao hidrogel obteve redução quando comparado ao controle. Analisando os resultados obtidos após o plaqueamento do biofilme da *C.tropicalis* observa-se que a utilização de 5x CIM também foi capaz de diminuir a quantidade de microrganismos quando comparado ao controle. Em ambos os casos observa-se que o resultado obtido pelo uso das substâncias foi semelhante ao obtido com o uso do controle positivo (Hipoclorito de sódio) e que quando utilizado sozinho, o hidrogel não possui ação contra as espécies de *Candida*.

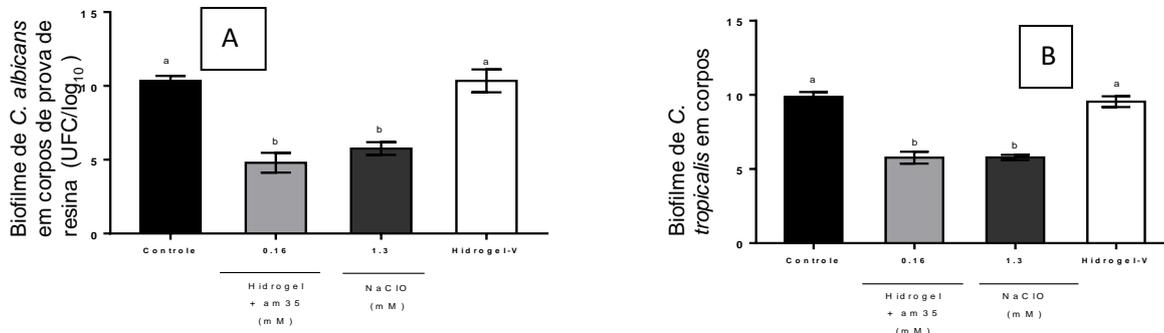


Figura 1. Viabilidade de biofilmes em formação de *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) tratados com a I-35 (5X MIC), Hipoclorito e com hidrogel sem associação a nenhum composto. Os resultados foram dados por UFC/ml (log<sub>10</sub>) Os dados foram comparados ao grupo tratado com o veículo onde  $p < 0.05$  – One-way ANOVA com Post test de Tukey.

Na figura 2, podem-se avaliar os resultados do biofilme misto de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* após o plaqueamento e para ambos a utilização do hidrogel associado a 5x o MIC da I-35 houve diminuição da quantidade de microrganismos quando comparado ao controle e ao hidrogel sem associação a nenhuma substância.

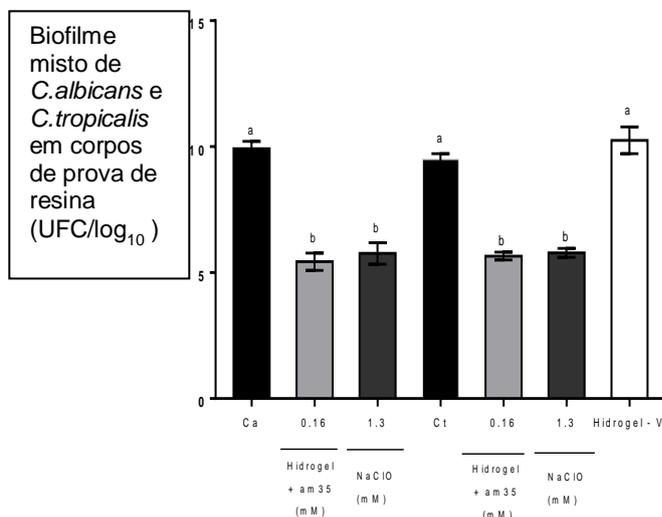


Figura 2- Viabilidade de biofilmes misto de *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B) tratados com a I-35 (5X MIC), Hipoclorito e com hidrogel sem associação a nenhum composto. Os resultados foram dados por UFC/ml (log<sub>10</sub>) Os dados foram comparados ao grupo tratado com o veículo onde  $p < 0.05$  – One-way ANOVA com Post test de Tukey.

### 3.3 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*. A substância I-35 bem como sua associação com o hidrogel (na concentração de 5X a Concentração Inibitória Mínima) não demonstrou efeitos tóxicos agudos nas 72h de observação, obtendo sobrevivência de 90% da *G. Mellonella*.

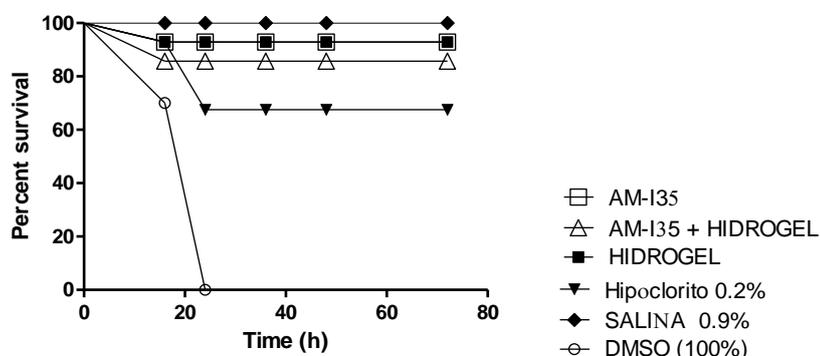


Figura 3. Toxicidade sistêmica *in vivo* do composto I-35 associado ao hidrogel em larva de *G. mellonella*. O composto não demonstrou efeitos tóxicos agudos.

### 3.4 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 25% a viabilidade celular. Faz-se necessário salientar, no entanto, que a determinação da toxicidade *in vitro* não representa fielmente o ocorrido com os seres *in vivo* frente ao uso do medicamento.

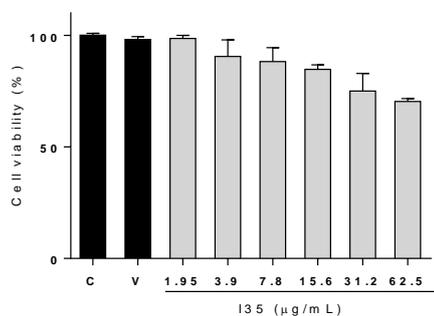


Figura 4. Toxicidade *in vitro* do composto I-35 em células FGH.

## 4- CONCLUSÕES

Mediante avaliação dos resultados obtidos, o composto I-35 associado ao hidrogel apresentou atividade antifúngica eficaz contra os biofilmes mono espécie e misto de *C. albicans* e *C. tropicalis* formados em corpos de prova de resina acrílica. Em todos os casos, a utilização de 5x a CIM do composto com o tratamento foi capaz de reduzir consideravelmente a quantidade de microrganismos, mostrando-se tão eficaz quanto o controle utilizado.

É possível concluir também que a I-35 demonstrou não ter toxicidade *in vivo* no modelo invertebrado *Galleria mellonella*, nem quando aplicada sozinha e nem quando associada ao hidrogel.

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.