



ELUSA SCHEIBLER

**EFEITO DO USO CONCOMITANTE DE CLOREXIDINA E NISTATINA
SOBRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DROGA: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Área de
Concentração: Estomatologia Clínica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Cherubini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Medina da Silva

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

S318e Scheibler, Elusa

Efeito do uso concomitante de clorexidina e nistatina sobre a atividade antifúngica da droga; estudo in vitro / Elusa Scheibler . – 2017.

83 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Cherubini.

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Medina da Silva.

1. Estomatologia clínica. 2. Candida albicans. 3. Clorexidina. I. Cherubini, Karen. II. Silva, Renata Medina da. III. Título.



Resumo

RESUMO

A candidíase é a infecção fúngica mais prevalente na cavidade oral de seres humanos. É uma infecção oportunista, que tem por fatores predisponentes a xerostomia, o uso de álcool e tabaco, próteses mal-higienizadas e mal-adaptadas, *diabetes mellitus*, deficiências nutricionais graves e condições imunossupressoras como infecção pelo HIV e quimioterapia. A nistatina e a clorexidina têm sido amplamente empregadas no controle de processos infecciosos da cavidade oral, algumas vezes simultaneamente. Entretanto, há relatos na literatura de que, se empregadas de forma combinada, essas drogas teriam interação antagônica. O presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito do uso concomitante de clorexidina e nistatina sobre *Candida albicans*. As drogas foram testadas em diferentes combinações, incluindo formulação única e formulações independentes empregadas de forma associada com diferentes intervalos de tempo. Os testes foram realizados determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) por meio do método de microdiluição em caldo, bem como avaliação do efeito sobre a densidade óptica das suspensões e biofilmes de *C. albicans*. A estabilidade da mistura de nistatina e clorexidina foi testada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A formulação única nistatina/clorexidina não exibiu CIM significativamente diferente dos respectivos fármacos empregados isoladamente. As combinações com intervalos de tempo intermediários tiveram CIM significativamente maior do que o fármaco isolado, exceto para a CIM da clorexidina ao intervalo de 10 min. De acordo com esses resultados, a combinação dos fármacos interfere nas respectivas CIMs, elevando-as, com exceção da CIM da clorexidina para formulação única. Comparadas ao uso das drogas isoladas, as combinações de nistatina e clorexidina exibiram atividade diminuída nos biofilmes de *C. albicans*, tendo o intervalo de 30 minutos o maior efeito antifúngico, e a formulação única, o menor. A mistura das drogas teve elevadas percentagens de degradação em todos os tempos avaliados.

Conclusão: A combinação de nistatina e clorexidina interfere na efetividade das drogas e também eleva as suas taxas de degradação.

Palavras-chave: Candidíase; Nistatina; Clorexidina; Microdiluição em caldo; *Candida albicans*.



Summary

SUMMARY

Candidiasis is the most prevalent fungal infection in the oral cavity of human beings. It is an opportunistic disease, which has predisposing factors such as xerostomia, alcohol and tobacco use, ill-fitted and poor cleaned dentures, *diabetes mellitus*, severe nutritional deficiencies and immunosuppressive conditions such as HIV infection and chemotherapy. Nystatin and chlorhexidine have been widely used to control oral infections, sometimes in an associated protocol. Nevertheless, there are reports about an antagonistic interaction when these drugs are combined. The present work aimed to analyze, *in vitro*, the effect of combined nystatin and chlorhexidine on *Candida albicans* and the stability of their mixture as well. The drugs were tested alone and in different combinations including single formulation and independent formulations with different time intervals. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the drugs was determined by the broth microdilution method, and also their effects on the optical density (OD) of suspensions and biofilms of *C. albicans* were evaluated. The stability of nystatin/chlorhexidine mixture was tested in high performance liquid chromatography (HPLC). Nystatin/chlorhexidine single formulation did not show a significantly different MIC compared to the drugs used alone. The combinations with time intervals between drugs showed higher MIC than the drugs alone, except for the MIC of chlorhexidine with 10-min interval. According to our results, the combination of the drugs interferes with the MIC, increasing its level, except for the chlorhexidine MIC in nystatin/chlorhexidine single formulation. Nystatin/chlorhexidine combinations showed impaired activity against *C. albicans* biofilms. Among the combinations, that with 30-min interval showed the highest antifungal effect and the single formulation the lowest. The drugs when combined showed high percentages of degradation at all the times evaluated.

Conclusion: The combination of nystatin and chlorhexidine interferes with their effectiveness and also increases their rate of degradation.

Key words: Candidiasis; Nystatin; Chlorhexidine; Broth Microdilution; *Candida albicans*.



Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	ARTIGO 1.....	20
2.1	Introduction.....	22
2.2	Nystatin.....	23
2.3	Chlorhexidine.....	27
2.4	Interactions of nystatin, chlorhexidine and other compounds.....	30
2.5	Final considerations.....	32
2.6	Acknowledgments.....	36
2.7	References.....	36
3	ARTIGO 2.....	41
3.1	Introduction.....	44
3.2	Material and methods.....	46
3.3	Results.....	50
3.4	Discussion.....	59
3.5	References.....	63
4	DISCUSSÃO GERAL.....	68
5	REFERÊNCIAS.....	72
6	ANEXOS	79



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A candidíase é a infecção fúngica mais prevalente na cavidade oral de seres humanos, sendo a *Candida albicans* o patógeno mais frequentemente envolvido (Barkvoll; Attramadal, 1989), e sua incidência tem aumentado nas últimas décadas. A enfermidade é classificada como uma infecção oportunista, que tem por fatores prediponentes a xerostomia, o uso de álcool e tabaco, desordens hormonais, próteses mal-higienizadas e mal-adaptadas (Garcia-Cuesta *et al.*, 2014), disfunção das glândulas salivares, *diabetes mellitus*, distúrbios endócrinos, hereditariedade, deficiências nutricionais graves e condições imunossupressoras como infecção pelo HIV e quimioterapia (Akpan; Morgan, 2002; Barkvoll; Attramadal, 1989; Ellepola, 2005; Garcia-Cuesta *et al.*, 2014; Olczak-Kowalczyk *et al.*, 2015).

A nistatina e a clorexidina são amplamente prescritas para o tratamento de infecções orais. A nistatina é um agente antifúngico do tipo polieno, com efeito fungistático e fungicida, de administração segura e pobre absorção no trato gastrointestinal (Brescansin *et al.*, 2013; Gunderson *et al.*, 2000; Sklenár *et al.*, 2013). Já a clorexidina é considerada um antisséptico padrão-ouro, com ação bactericida e bacteriostática, e tem como vantagem a substantividade, que é a capacidade de ligar-se aos tecidos moles e duros da cavidade oral, o que permite ação por longos períodos após a administração (Varoni *et al.*, 2012).

Há relatos de que o uso concomitante de nistatina e clorexidina estaria contraindicado em função de resultar na formação de um sal desprovido do desejado efeito farmacológico (Barkvoll; Attramadal, 1989; Epstein *et al.*, 1992; Gaibi, 2006). Entretanto, a literatura exhibe aspectos controversos a esse respeito, com alguns relatos de indicação

de seu uso combinado (Gaibi, 2006). Barkvoll e Attramadal (1989) testaram, *in vitro*, a efetividade da combinação das substâncias em cultura de *Candida albicans*. Os autores verificaram que a concentração inibitória mínima (CIM) foi expressivamente maior para a combinação das drogas do que para cada um dos fármacos isoladamente, sugerindo que o digluconato de clorexidina e a nistatina sejam, ambos, inibidores do crescimento de *C.albicans*, mas com efeito antagonista entre si. O estudo de Barkvoll e Attramadal (1989) parece ser o mais consistente a investigar o uso combinado dos fármacos. No entanto, alguns aspectos metodológicos favorecem as contestações da literatura quanto à aplicabilidade dos resultados desse estudo à rotina clínica, quais sejam o uso combinado das drogas com volumes iguais em formulação única, bem como do teste de difusão em ágar (CLSI, 2008) e a ausência de análise química da mistura. Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo analisar, *in vitro*, a estabilidade da mistura e o efeito da combinação de clorexidina e nistatina sobre cultivos de *Candida albicans*. O trabalho foi estruturado sob a forma de dois artigos científicos, sendo que o primeiro apresenta uma revisão da literatura sobre o tema, e o outro consiste na apresentação do experimento conduzido.



Discussão Geral

4 DISCUSSÃO GERAL

A presente pesquisa foi inspirada no fato de a nistatina e a clorexidina serem amplamente prescritas para tratamento e prevenção de infecções orais e, ao mesmo tempo, existirem relatos da contra-indicação de seu uso combinado. Isso se deveria à formação de um sal insolúvel quando as drogas são misturadas (Barkvoll; Attramadal, 1989; Gaibi, 2006). Alguns autores também orientam que seja respeitado o intervalo de 30 minutos entre o uso da clorexidina e a escovação dentária, para prevenir interações entre a estrutura catiônica da mesma e componentes aniônicos como o lauril sulfato de sódio e o fluoreto presentes em dentifrícios (De Paola; Spolarich, 2007).

Embora Barkvoll e Attramadal (1989) contraindiquem o uso combinado de clorexidina e nistatina, o assunto ainda é cercado de algumas dúvidas, havendo controvérsia sobre a verdadeira interação entre os fármacos e também sobre a existência de um intervalo de tempo entre o uso de ambos que fosse classificado como seguro (Barkvoll; Attramadal, 1989; Gaibi, 2006). Considerando que a literatura carece de estudos que investiguem essas interações com rigor metodológico, o presente estudo avaliou o efeito do uso combinado de nistatina e clorexidina sobre culturas em suspensão e biofilmes de *Candida albicans*, bem como testou a estabilidade química da mistura das drogas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e da densidade óptica (DO) das culturas de *C. albicans* em suspensão não exibiram diferença significativa ao comparar-se a formulação única de nistatina/clorexidina com as drogas usadas isoladamente. De modo geral, as demais combinações, empregando diferentes intervalos de tempo entre as drogas, exibiram CIM maior que as drogas isoladas. Por outro lado, quando testadas as menores

concentrações das drogas, a combinação das mesmas teve melhor efeito que o uso isolado. Nos ensaios com biofilmes de *C. albicans*, que parecem simular melhor o microambiente encontrado *in vivo*, a formulação única de nistatina/clorexidina mostrou-se menos efetiva quando comparada às drogas empregadas de forma isolada. As combinações a diferentes intervalos de tempo também tiveram seu efeito prejudicado, com exceção do intervalo de 30 minutos, que não diferiu significativamente das drogas empregadas isoladamente. Esses achados para o ensaio com biofilme estão de acordo com o intervalo de 30 minutos entre o uso da clorexidina e dentifrícios preconizado na literatura (De Paola; Spolarich, 2007).

Nos ensaios de HPLC, a mistura nistatina/clorexidina exibiu elevado percentual de degradação para ambas as drogas em todos os tempos avaliados (*baseline*, 24 horas e 48 horas). Ainda, a inspeção visual evidenciou um precipitado de coloração amarelada nas formulações contendo a mistura de clorexidina e nistatina, o que corrobora os achados de Barkvoll e Attramadal (1989).

Alguns vieses metodológicos devem ser considerados, já que estudos *in vitro* não reproduzem fielmente as condições *in vivo*. Nesse contexto, fatores ambientais podem ter influenciado os ensaios de CIM e a análise da DO das culturas em suspensão. Segundo as normas do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), a determinação da CIM deve ser realizada em pH neutro. Entretanto, *in vivo*, o pH é variável e tanto as características dos microrganismos quando das drogas testadas variam com diferentes condições ambientais de pH e temperatura (de Vasconcellos *et al.*, 2014; Lampen *et al.*, 1959). Ainda, o fato de não ter contemplado espécies de *Candida* não-*albicans* nos cultivos testados nem a inclusão de espécies bacterianas nos biofilmes pode ser considerado uma limitação do presente estudo.

Apesar das limitações inerentes a um estudo *in vitro*, a presente pesquisa evidenciou que o uso combinado de nistatina e clorexidina pode, de fato, interferir na atividade

antifúngica das drogas. Elevação da CIM e menor efeito antifúngico nos biofilmes de *C. albicans* foram verificados por ocasião do uso combinado. Além disso, os elevados percentuais de degradação tanto da nistatina quanto da clorexidina quando em formulação única, verificados em todos os tempos analisados, reforçam a possibilidade de interação química entre ambas. Esse achado é corroborado pela observação do precipitado nas formulações contendo a mistura das drogas. Por outro lado, os achados para a DO das culturas em suspensão quando do uso de baixas concentrações de clorexidina e nistatina sugerem que, caso sejam empregadas concentrações subterapêuticas, o uso combinado pode ter melhor efeito que as drogas isoladas. Talvez seja este o fator responsável pelas evidências clínicas contraditórias que levam alguns autores a defenderem o uso combinado de nistatina e clorexidina (Gaibi, 2006).

De acordo com os resultados do presente estudo, antes de prescrever o uso clínico de nistatina e clorexidina de forma combinada, o profissional deve considerar a possibilidade de interação química entre ambas e seu consequente prejuízo à ação terapêutica. Ainda, entre os tempos testados, o intervalo de 30 minutos entre as drogas parece o mais apropriado em situações em que, porventura, o uso combinado se faça necessário. Novos estudos empregando biofilmes com multiespécies de *Candida* spp. e também espécies bacterianas, bem como diferentes condições de pH e temperatura podem trazer novos esclarecimentos sobre o assunto e nortear a conduta clínica de forma mais adequada.