

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CAROLINA WOINAROVICZ MENEGHETTI

CREMES ADESIVOS CONTENDO NISTATINA OU COMPLEXO NISTATINA: β -
CICLODEXTRINA PARA O TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA:
VALIDAÇÃO ANALÍTICA, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DE REMOÇÃO POR
ESCOVAÇÃO

PONTA GROSSA

2026

CAROLINA WOINAROVICZ MENEGHETTI

CREMES ADESIVOS CONTENDO NISTATINA OU COMPLEXO NISTATINA: β -
CICLODEXTRINA PARA O TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA:
VALIDAÇÃO ANALÍTICA, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DE REMOÇÃO POR
ESCOVAÇÃO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas dos Materiais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nara Hellen Campanha Bombarda.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Migliorini Urban.

PONTA GROSSA
2026

M541 Meneghetti, Carolina Woinarovicz
Cremes adesivos contendo nistatina ou complexo nistatina:β-ciclodextrina para o tratamento da estomatite protética: validação analítica, avaliação biológica e de remoção por escovação / Carolina Woinarovicz Meneghetti. Ponta Grossa, 2026.
114 f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda.
Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban.

1. Estomatite sob prótese. 2. Nistatina. 3. Beta-ciclodextrinas. 4. Candida albicans. 5. Administração bucal. I. Bombarda, Nara Hellen Campanha. II. Urban, Vanessa Migliorini. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. IV.T.

CDD: 617.6

CAROLINA WOINAROVICZ MENEGHETTI

CREMES ADESIVOS CONTENDO NISTATINA OU COMPLEXO NISTATINA:β-
CICLODEXTRINA PARA O TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA:
VALIDAÇÃO ANALÍTICA, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E DE REMOÇÃO POR
ESCOVAÇÃO

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Odontologia pela
Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Área de Concentração em
Clínica Integrada. Linha de pesquisa
em Propriedades Físico-Químicas e
Biológicas dos Materiais.

Ponta Grossa, 09 de outubro de 2026.

Documento assinado digitalmente
 NARA HELLEN CAMPANHA BOMBARDA
Data: 15/10/2026 15:37:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Nara Hellen Campanha Bombarda – Orientadora
Doutora em Reabilitação Oral
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Documento assinado digitalmente
 ANDRES FELIPE CARTAGENA MOLINA
Data: 13/10/2026 15:03:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Andrés Felipe Cartagena-Molina
Doutor em Odontologia
Universidade Estadual do Norte do Paraná

Documento assinado digitalmente
 JANAINA HABIB JORGE
Data: 13/10/2026 14:57:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Janaina Habib Jorge
Doutora em Reabilitação Oral
Universidade Estadual Paulista

Documento assinado digitalmente
 EDUARDO BAUML CAMPAGNOLI
Data: 13/10/2026 11:53:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli
Doutor em Estomatopatologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Documento assinado digitalmente
 ALFONSO SANCHEZ AYALA
Data: 13/10/2026 18:15:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alfonso Sanchez Ayala
Doutor em Clínica Odontológica
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico esta tese as minhas amadas avós

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Nara Hellen Campanha Bombarda, por dividir seu conhecimento e ensinar grande parte do que sei hoje.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Vanessa Migliorini Urban, pela disponibilidade e competência em auxiliar em momentos de dúvidas e dificuldades durante a pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Priscileila Colerato Ferrari, por apoiar as minhas ideias e me ensinar com maestria sobre a área farmacêutica, por acolher meus questionamentos com grande compreensão e disponibilidade.

À Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo, pela disponibilidade e atenção ao ensaio de citotoxicidade.

À Prof.^a Dr.^a Carmen Antonia Sanches Ito, pela disponibilidade e atenção ao ensaio de microbiológico de halo de inibição.

Às minhas colegas de pesquisa Ms.^a Thaynara Alves Pedroso, Ms.^a Marcela Alves Mattos e Ms.^a Thaís Letícia Moreira da Silva, que muito contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às orientandas de iniciação científica, Giulia Ricetti Favero e Luiza Abreu Costa, que muito se dedicaram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Daniel e Vera, ao meu namorado, Matheus, aos meus irmãos, Daniella e Lucas, e à minha tia, Geovana, pelo amor, carinho, compreensão e apoio incondicional, fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate, pelo suporte institucional e pelas condições oferecidas para a realização e conclusão deste doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPG, pela oportunidade de realização deste doutorado, pelo suporte administrativo e pela sólida formação acadêmica oferecida ao longo destes anos.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido por meio da Bolsa de Doutorado, durante 2 anos, Código de Financiamento 001.

RESUMO

MENEGHETTI, Carolina Woinarovicz. **Cremes adesivos contendo nistatina ou complexo nistatina: β -ciclodextrina para o tratamento da estomatite protética: validação analítica, avaliação biológica e de remoção por escovação.** Orientadora: Nara Hellen Campanha Bombarda. Coorientadora: Vanessa Migliorini Urban. Ponta Grossa, 2026. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2026.

A incorporação de nistatina (Nys), livre ou complexada à β -ciclodextrina (Nys: β CD), em cremes adesivos protéticos representa uma alternativa promissora, de fácil aplicação e possível redução do tempo de tratamento da estomatite protética (EP). Este estudo avaliou a liberação de Nys, as propriedades biológicas e a remoção por escovação de um creme adesivo protético (DAC) contendo Nys (DACNys) ou Nys: β CD (DACNys: β CD). O método de quantificação de Nys livre ou complexada por espectrofotometria UV-Vis (305 nm) foi desenvolvido e validado. A liberação de Nys livre ou complexada foi avaliada em células de difusão de Franz (30–480 min), enquanto a fotoestabilidade foi investigada após exposição à radiação UV-C, por meio da quantificação do teor residual de Nys. A atividade antifúngica contra *Candida albicans* foi determinada por difusão em ágar. A atividade antibiofilme foi avaliada em poliestireno, por XTT e contagem de UFC/mL, e em resina acrílica, por XTT e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A citotoxicidade foi determinada em fibroblastos NIH/3T3 (ensaio de MTT). A remoção dos cremes de espécimes de resina acrílica, após os protocolos de higienização, foi quantificada por análise fotográfica padronizada. Os resultados mostraram que DACNys: β CD apresentou maior liberação cumulativa de Nys, com diferença estatística a partir de 360 min ($p < 0,0001$), atingindo 205,49 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 480 min, comparado a 65,99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para DACNys. Na fotoestabilidade, DACNys: β CD manteve 96,5–99,1% do teor de Nys, enquanto DACNys apresentou degradação progressiva, atingindo aproximadamente 80% na condição exposta e 88% na protegida após 24 h. Ambas as formulações apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* (zonas de inibição de 7,71–12,08 mm; $p < 0,05$), reduziram a atividade metabólica do biofilme em mais de 95% após 3 h e inibiram o crescimento planctônico. Em resina acrílica, DACNys: β CD e DACNys reduziram o biofilme em 79,31% e 76,92%, respectivamente, com alterações estruturais confirmadas por MEV. A viabilidade dos fibroblastos 3T3 manteve-se acima de 70% nas diluições $\geq 1/640$, exceto para DACNys (desde 1/1280). A escovação favoreceu a remoção dos cremes adesivos. Conclui-se que a complexação com β -ciclodextrina aumentou a liberação e a fotoestabilidade da Nys, com melhor perfil de biocompatibilidade em menores diluições. Ambas as formulações apresentaram atividade antifúngica e antibiofilme contra *C. albicans* e foram removidas por escovação. Por associar a fixação da prótese à ação antifúngica, o creme adesivo apresenta potencial para favorecer a permanência local do antifúngico e aumentar sua substantividade, podendo contribuir para otimizar o tratamento, favorecer a adesão terapêutica e proporcionar maior conforto e aceitação pelos usuários de prótese.

Palavras-chave*: estomatite sob prótese; nistatina; beta-ciclodextrinas; *Candida albicans*; administração bucal; sistemas de liberação de medicamentos.

*Descritos segundo o DeCS/MeSH.

ABSTRACT

MENEGHETTI, Carolina Woinarovicz. **Adhesive creams containing nystatin or nystatin: β -cyclodextrin complex for the treatment of denture stomatitis: analytical validation, biological evaluation, and removal by brushing.** Advisor: Nara Hellen Campanha Bombarda. Co-advisor: Vanessa Migliorini Urban. Ponta Grossa, 2026. Thesis (Doctorate in Dentistry) – State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2026.

The incorporation of nystatin (Nys), either free or complexed with β -cyclodextrin (Nys: β CD), into denture adhesive creams may represent a promising, easy-to-apply approach for the treatment of denture stomatitis (DS), with the potential to shorten treatment duration. This study evaluated Nys release, biological properties, and removal by brushing of a denture adhesive cream (DAC) containing Nys (DACNys) or Nys: β CD (DACNys: β CD). The UV-Vis spectrophotometric method (305 nm) for quantifying free or complexed Nys was developed and validated. Nys release was evaluated using Franz diffusion cells (30–480 min), while photostability was investigated after exposure to UV-C radiation by quantifying the residual Nys content. Antifungal activity against *Candida albicans* was determined by the agar diffusion method. Antibiofilm activity was evaluated on polystyrene using the XTT assay and CFU/mL counts, and on acrylic resin using the XTT assay and scanning electron microscopy (SEM). Cytotoxicity was assessed in NIH/3T3 fibroblasts using the MTT assay. Removal of the creams from acrylic resin specimens following different cleaning protocols was quantified by standardized photographic analysis. DACNys: β CD exhibited greater cumulative Nys release, with a statistically significant difference from 360 min onward ($p < 0.0001$), reaching 205.49 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ at 480 min, compared with 65.99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for DACNys. Regarding photostability, DACNys: β CD retained 96.5–99.1% of its Nys content, whereas DACNys showed progressive degradation, reaching approximately 80% under exposed conditions and 88% under protected conditions after 24 h. Both formulations exhibited antifungal activity against *C. albicans* (inhibition zones of 7.71–12.08 mm; $p < 0.05$), reduced biofilm metabolic activity by more than 95% after 3 h, and inhibited planktonic growth. On acrylic resin, DACNys: β CD and DACNys reduced biofilm by 79.31% and 76.92%, respectively, with structural changes confirmed by SEM. Fibroblast viability remained above 70% at dilutions $\geq 1:640$, except for DACNys, for which this threshold was observed from the 1:1280 dilution onward. Brushing facilitated the removal of the denture adhesive creams. It was concluded that complexation with β -cyclodextrin increased Nys release and improved photostability, with a more favorable biocompatibility profile at lower concentrations. Both formulations demonstrated antifungal and antibiofilm activity against *C. albicans* and were removable by brushing. By combining denture retention with antifungal activity, the adhesive cream may favor local antifungal retention and increase its substantivity, potentially optimizing treatment, promoting therapeutic adherence, and improving comfort and treatment acceptability among denture wearers.

Keywords*: denture stomatitis; nystatin; beta-cyclodextrins; *Candida albicans*; buccal administration; drug delivery systems.

* Described according to DeCS/MeSH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – a) Homogeneização das fases oleosa e aquosa no equipamento SpeedMixer; b) Resultado do creme adesivo após emulsionado.....	41
Figura 2 – a) Quantificação precisa do etanol; b) Agitação contínua das soluções de β -ciclodextrina e de Nys em agitador magnético; c) Aspecto físico final do complexo Nys: β CD após liofilização.....	42
Figura 3 – a) Creme adesivo experimental base (DAC); b) DAC e complexo Nys: β CD antes da homogeneização; c) Após homogeneizado, aspecto final do DACNys: β CD.....	42
Figura 4 – Delineamento experimental do estudo.....	44
Figura 5 – Sistema de células de difusão vertical de Franz empregado nos ensaios de liberação <i>in vitro</i> , sob agitação contínua e controle térmico a 37 °C.....	47
Figura 6 – Desenho esquemático da célula de difusão vertical de Franz utilizada no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	48
Figura 7 – Amostras dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD e DAC, acondicionadas em recipientes transparentes, utilizados para exposição à radiação UV-C (254 nm), e em recipientes opacos, destinados à proteção da luz (controle). Ambas as condições foram mantidas sob os mesmos parâmetros experimentais (tempo e temperatura).....	49
Figura 8 – Extração do fármaco a partir dos cremes adesivos, no qual aproximadamente 0,5 g da amostra foi transferido para um béquer contendo 30 mL de metanol, seguido de agitação magnética e posteriormente de sonicação: a) Formulações protegidas da luz foram envoltas em papel alumínio durante o preparo, a fim de evitar exposição luminosa; b) Grupo de formulações expostas a luz.....	50
Figura 9 – Determinação do pH dos cremes adesivos: a) Aspecto final do extrato do DACNys; b) DACNys: β CD após dispersão água destilada (1:10, p/v); c) Mensuração do pH com eletrodo imerso no sobrenadante aquoso após estabilização do potencial (30–60 s).....	52
Figura 10 – Determinação da espalhabilidade pelo método das placas paralelas, com aplicação de 125 g por 1 minuto sobre aproximadamente 1 g da amostra (25 $\pm$ 2 °C).....	53
Figura 11 – Reativação e preparo de <i>C. albicans</i> ATCC 90028: a) Crescimento inicial em ágar YEPD por 24 h; b) Subcultivo em ágar Sabouraud Dextrose (SDA) a 35 $\pm$ 2 °C por 24 h; c) Placas contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 μ g/mL de azul de metileno.....	54
Figura 12 – a) Pré-inóculo obtido após 16 h de crescimento em estufa bacteriológica a 37°C; b) Pré-inóculo sendo centrifugado a 4.000 rpm, a 4°C por 15 min.....	55

Figura 13 – a) Alíquota de 10 µL da suspensão do inóculo diluída a 10 ³ – semeada em ASD, incubadas a 37 °C por 48 h; b e c) 100 µL de inóculo inoculado em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços.....	56
Figura 14 – Poços tratados com seus respectivos extratos de tratamentos.....	57
Figura 15 – Células planctônicas após diluição, sendo semeados em triplicata em placas de ASD.....	58
Figura 16 – Ação dos sais de tetrazólio XTT: a) Após 3 h; b) Após 6 h.....	59
Figura 17 – a) Adição do monômero ao polímero; b) Homogeneização da mistura com espátula; c) Espera até que a resina atinja a fase plástica; d–e) Inserção da resina nos moldes de silicone; f) Mufla preenchida com os moldes.....	60
Figura 18 – Posicionamento dos espécimes em placa de 24 poços e adição do inóculo de <i>C. albicans</i> (2 m) sobre a superfície de interesse.....	61
Figura 19 – a) Espécimes imersos em meio RPMI suplementado com 2% de glicose, protegidos da luz e incubados em agitador orbital por 24 h, a 75 rpm e 37 °C, seguidos da substituição do meio e nova incubação por mais 24 h nas mesmas condições; b) Aplicação dos respectivos tratamentos, consistindo em solução contendo 30 mg de cada adesivo, previamente diluída em 1 mL de PBS, mantida em contato com os espécimes por 6 h, sob proteção da luz e agitação orbital.....	62
Figura 20 – a) Espécimes contaminados e tratados foram lavados com 2 mL de PBS; b) Transferidos para poços individuais de placas de 24 poços e incubados com 2 mL de solução de XTT.....	62
Figura 21 – A partir de 1,6 mL do conteúdo de cada poço, transferida para microtubos e centrifugada a 10.000 rpm por 2 min, a 10 °C, alíquota de 200 µL foram pipetados em triplicata, em placa de 96 poços.....	63
Figura 22 – a) Preparo da solução inicial dos materiais após diluição de 20 mg em 1600 µL de meio RPMI-1640; b) Preparo das diluições seriadas a partir da solução estoque, obtendo-se diferentes concentrações de tratamento; c) Distribuição dos tratamentos em placa de 96 poços com tratamentos em diferentes diluições.....	65
Figura 23 – a) Mufla plástica preenchida com gesso e os moldes em silicone laboratorial com formato retangular, nos quais foi inserida resina acrílica termopolimerizável para a confecção dos corpos de prova; b) Espécimes com 0,025g de adesivo aplicados sobre cada um deles.....	66
Figura 24 – a) Sistema de escovação padronizado, no qual a escova elétrica foi acoplada a um suporte fixo, com aplicação de carga constante de 190 g durante o procedimento; b) Recipiente tipo Dappen utilizado para acondicionamento do espécime juntamente com a respectiva solução.....	67

Figura 25 – a) 250 mL de água destilada aquecida a 38 °C, com temperatura verificada por termômetro digital; b) Espécime imerso em solução de água destilada morna contendo pastilha Corega Tabs®; c) Procedimento de escovação com a própria solução de Corega Tabs® por 1 minuto.....	68
Figura 26 – Câmera posicionada em suporte fixo, mantendo o eixo óptico perpendicular (90°) à superfície dos espécimes e distância focal padronizada.....	68
Figura 27 – Curva de calibração da Nys obtida por UV-Vis a 305 nm, relacionando a absorbância com a concentração (1–10 µg/mL), após ajustes adequados pelo MMQP.....	71
Figura 28 – Espectros de absorção na região do ultravioleta (240–400 nm) da nistatina livre (Nys), do complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina (Nys:βCD) e do creme adesivo para prótese sem fármaco (DAC).....	73
Figura 29 – Avaliação da robustez do método de UV-vis para quantificação de Nys sob pequenas variações nas condições de tempo de preparo e adição de solvente, expressos pela média ± desvio padrão de três concentrações (baixa, média e alta).....	75
Figura 30 – Curva de calibração da Nys:βCD obtida por UV-Vis a 305 nm, relacionando a absorbância com a concentração (1–10 µg/mL).....	76
Figura 31 – Avaliação da robustez do método de UV-vis para quantificação de Nys:βCD sob pequenas variações nas condições de tempo de preparo e lotes diferentes de Nys:βCD, expressos pela média ± desvio padrão de três concentrações (baixa, média e alta).....	78
Figura 32 – Perfil de liberação in vitro da Nys a partir dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD ao longo de 480 min, avaliado em células de difusão de Franz.....	79
Figura 33 – Média ± desvio-padrão da absorbância dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD expostas à radiação UV-C por 0, 24, 48, 72 e 168 h.....	81
Figura 34 – Registros fotográficos padronizados (distância fixa de 20 cm) dos cremes adesivos DAC, DACNys e DACNys:βCD, nas condições exposta e protegida da radiação UV-C, nos tempos de 24, 48 e 72 h: a–c) 24 h exposto; d–f) 24 h protegido; g–i) 48 h exposto; j–l) 48 h protegido; m–o) 72 h exposto; p–r) 72 h protegido.....	83
Figura 35 – Detalhe do creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina (DACNys:βCD) após 72 h de exposição à radiação UV-C, evidenciando a presença de pequenos grumos na superfície, caracterizando a alteração no parâmetro homogeneidade (escore 2) descrita na Tabela 3.....	84
Figura 36 – Espalhabilidade (média ± desvio padrão) das formulações DAC, DACNys e DACNys:βCD em função do tempo (24 h, 48 h e 72 h), nos períodos exposto e protegido à luz UV-C.....	85

Figura 37 – Zonas de inibição do crescimento de <i>C. albicans</i> após difusão dos fármacos em meio RPMI, após (a) 3 h e (b) 6 h de incubação. Tratamentos aplicados em cada disco de filtro: (1) DAC, (2) Fluconazol 25 µg (controle positivo), (3) UCC, (4) DACNys e (5) DACNys:βCD.....	87
Figura 38 – Quantificação de células planctônicas viáveis, expressa em UFC/mL, nos sobrenadantes dos poços após os tratamentos submetidos à liberação do fármaco em meio RPMI por 3 h e 6 h.....	89
Figura 39 – Percentual de redução da atividade metabólica do biofilme de <i>C. albicans</i> em espécimes de resina acrílica após tratamento por 6 h com os respectivos tratamentos, avaliado pelo ensaio XTT.....	90
Figura 40 – Imagens obtidas por MEV dos espécimes de resina acrílica tratados com os cremes adesivos DAC, DACNys, DACNys:βCD e UCC, bem como do grupo controle de <i>C. albicans</i> , em diferentes aumentos (10k×, 5k× e 2k×).....	92
Figura 41 – Imagens obtidas por MEV de <i>C. albicans</i> no aumento de 20.000×, após tratamento com: a) DACNys:βCD; b) DACNys. As setas azuis indicam alterações morfológicas observadas nas estruturas filamentosas e celulares, enquanto as setas vermelhas destacam blastoconídios com aspecto compatível com deformação estrutural.....	93
Figura 42 – Média ± desvio padrão da viabilidade celular (%) após exposição aos cremes adesivos, determinada pelo ensaio de MTT.....	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição dos cremes adesivos experimentais para prótese (DACNys, DACNys:βCD, DAC), do controle comercial UCC e da suspensão oral de nistatina.....	40
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Síntese dos principais resultados da caracterização dos cremes adesivos contendo nistatina ou complexo nistatina:β-ciclodextrina, segundo Meneghetti (2024a).....	31
Tabela 2 – Principais resultados do ensaio de remoção de adesivos protéticos comerciais.....	37
Tabela 3 – Critérios de avaliação organoléptica dos cremes adesivos.....	51
Tabela 4 – Resultado do teste F da Anova para determinação da significância do coeficiente angular para a nistatina.....	72
Tabela 5 – Resultado do teste F da Anova para determinação da significância do coeficiente angular para a nistatina:β-ciclodextrina.....	77
Tabela 6 – Parâmetros de ajuste dos modelos cinéticos testados para o perfil de liberação de DACNys e DACNys:βCD.....	79
Tabela 7 – Parâmetros do modelo de Korsmeyer–Peppas ($F = kKP \cdot t^n$) ajustado aos dados de liberação.....	80
Tabela 8 – Teor remanescente de nistatina (%) nos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD armazenadas sob exposição e proteção à luz.....	82
Tabela 9 – Escores da avaliação organoléptica dos cremes adesivos expostos e protegidos da radiação UV-C.....	84
Tabela 10 – Valores de pH dos cremes adesivos DAC, DACNys:βCD e DACNys, avaliados nos diferentes tempos e condições experimentais. Os valores são apresentados como média (desvio-padrão).....	86
Tabela 11 – Zonas de inibição de crescimento (mm) de <i>C. albicans</i> promovido pelos extratos dos cremes adesivos DACNys, DACNys:βCD, DAC e UCC obtidos nos tempos de liberação de 3 h e 6 h, em meio de cultura RPMI.....	86
Tabela 12 – Percentual de redução da viabilidade metabólica do biofilme de <i>C. albicans</i> pelo ensaio XTT nos tempos de 3 h e 6 h.....	88
Tabela 13 – Contagem de células planctônicas viáveis de <i>C. albicans</i> nos sobrenadantes dos poços, expressa em $\log_{10}(\text{UFC/mL})$, após 3 e 6 h de exposição aos tratamentos em meio RPMI.....	89
Tabela 14 – Percentual de adesivo remanescente após diferentes métodos de higienização, expresso em mediana e intervalo interquartil.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
ASD	ágar sabouroad dextrose
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DAC	creme adesivo protético
DACNys	creme adesivo protético contendo nistatina
DACNys:βCD	creme adesivo protético contendo o complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina
EP	estomatite protética
FTIR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
Nys	nistatina
Nys:βCD	nistatina:β-ciclodextrina
NysOS	suspensão oral de nistatina
PBS	solução salina tamponada com fosfato
UCC	Ultra Corega Creme Sem Sabor ®
UFC	unidades formadoras de colônia
UV-C	radiação ultravioleta C
UV-vis	espectrofotometria no ultravioleta-visível
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio hidróxido
λ _{máx}	comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	ESTOMATITE PROTÉTICA E DESAFIOS NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR <i>C. ALBICANS</i>	22
3.2	NISTATINA NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA.....	23
3.3	ADESIVOS PROTÉTICOS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	26
3.4	β -CICLODEXTRINA COMO ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACÊUTICAS.....	31
3.5	AVALIAÇÃO ANALÍTICA E FARMACÊUTICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO NISTATINA.....	33
3.6	REMOÇÃO DE CREMES ADESIVOS PROTÉTICOS.....	36
3.7	ADESIVOS PROTÉTICOS.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	MATERIAL.....	40
4.1.1	Confecção dos cremes adesivos.....	40
4.2	MÉTODOS.....	42
4.2.1	Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico (UV-Vis) para quantificação de Nys livre ou complexada.....	44
4.2.2	Liberação in vitro de Nys livre ou complexa a partir dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD.....	46
4.2.3	Fotoestabilidade.....	49
4.2.3.1	Determinação do teor de Nys por espectrofotometria UV-Vis.....	50
4.2.3.2	Ensaio organoléptico.....	51
4.2.3.3	Determinação de pH.....	52
4.2.3.4	Espalhabilidade.....	52
4.2.4	Difusão em ágar.....	53
4.2.5	Atividade metabólica sobre biofilme de <i>C. albicans</i>.....	55
4.2.5.1	Contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).....	57
4.2.5.2	Ensaio de viabilidade metabólica (XTT).....	58
4.2.6	Atividade metabólica de biofilme de <i>C. albicans</i> em espécimes de resina acrílica.....	59

4.2.6.1	Confecção dos espécimes.....	59
4.2.6.2	Formação do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre o espécime de resina acrílica.....	61
4.2.6.3	Ensaio de redução do XTT.....	62
4.2.6.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63
4.2.7	Citotoxicidade (MTT).....	64
4.2.8	Facilidade de remoção de adesivos em espécimes de resina acrílica.....	66
4.2.9	Análise estatística.....	69
5	RESULTADOS.....	70
5.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (UV-VIS) PARA QUANTIFICAÇÃO DE NISTATINA LIVRE.....	70
5.1.1	Linearidade.....	70
5.1.2	Seletividade.....	72
5.1.3	Precisão e exatidão.....	73
5.1.4	Limite de detecção e de quantificação.....	74
5.1.5	Robustez.....	74
5.2	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (UV-VIS) PARA QUANTIFICAÇÃO DO COMPLEXO NYS:βCD.....	75
5.2.1	Linearidade.....	75
5.2.2	Precisão e exatidão.....	77
5.2.3	Limite de detecção e quantificação.....	77
5.2.4	Robustez.....	77
5.3	ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ.....	78
5.3.1	Ajuste aos modelos cinéticos de liberação.....	79
5.4	FOTOESTABILIDADE.....	80
5.4.1	Avaliação organoléptica e visual.....	82
5.4.2	Espalhabilidade.....	85
5.4.3	Determinação de pH.....	85
5.5	DIFUSÃO EM ÁGAR.....	86
5.6	ATIVIDADE METABÓLICA DE BIOFILME DE <i>C. albicans</i> FORMADO NO FUNDO DE POÇOS.....	87
5.7	ATIVIDADE METABÓLICA DE BIOFILME DE <i>C. albicans</i> FORMADO SOBRE ESPÉCIMES DE RESINA ACRÍLICA.....	90
5.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (MTT).....	93

5.9	REMOÇÃO DOS CREMES ADESIVOS DE SUPERFÍCIE DE RESINA ACRÍLICA.....	95
6	DISCUSSÃO.....	97
7	CONCLUSÃO.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma doença inflamatória crônica que acomete a mucosa oral de aproximadamente 11% a 70% dos usuários de próteses removíveis (Perić *et al.*, 2024). Sua etiologia é multifatorial, envolvendo fatores locais como próteses desadaptadas, antigas, seu uso noturno e falta de higiene adequada, além de fatores sistêmicos, como imunossupressão e baixa imunidade do hospedeiro. A EP está associada à microrganismos comensais da microbiota oral, com destaque para fungos do gênero *Candida*, especialmente a espécie *Candida albicans* que, em situações de desequilíbrio, podem tornar-se patogênicos (Perić *et al.*, 2024; Lombardi; Ouanounou, 2020; Hilgert *et al.*, 2016).

Clinicamente, essa condição caracteriza-se por uma resposta inflamatória local, manifestando-se por dor, edema, eritema e sensação de queimação na região subjacente à prótese. Seu manejo envolve medidas como a higienização adequada da cavidade bucal e da prótese, ajustes na adaptação protética, desinfecção e substituição de próteses antigas, além do uso de antifúngicos tópicos ou, em casos mais severos, antifúngicos sistêmicos (Perić *et al.*, 2024; Lombardi; Ouanounou, 2020; Martins; Gontijo, 2017). A terapia tópica com bochechos de nistatina (Nys) tem sido considerada a primeira escolha de tratamento de EP (Rai *et al.*, 2022; Iqbal *et al.*, 2015), entretanto, existem limitações quanto à disponibilidade, permanência na cavidade oral, baixa solubilidade e sabor amargo, resultando em recorrência da infecção (Lombardi; Budtz-Jørgensen, 1993; Martins; Gontijo, 2017; Almoyad, 2025).

Pensando em melhorar propriedades como, solubilidade, sabor e liberação da Nys, um sistema de liberação controlada foi desenvolvido e caracterizado por Urban *et al.* (2023). Esse sistema envolve o fármaco em um oligossacarídeo cíclico (β -ciclodextrina) e cria um complexo de inclusão para o fármaco. Resultados *in vitro* demonstram que a complexação da Nys com β -ciclodextrina (Nys: β CD) pode aumentar a solubilidade, a eficiência de dissolução e promover liberação sustentada do fármaco, além de reduzir sua toxicidade quando comparada à forma livre, mantendo a atividade antifúngica contra *C. albicans* (Urban *et al.*, 2023; Moraes *et al.*, 2024). Até o momento, a Nys: β CD foi utilizada em uma formulação já existente, o condicionador de tecido de marca comercial, em um modelo *in vitro* e *in vivo* (Urban *et al.*, 2023; Moraes *et al.*, 2024), e em hidrogéis mucoadesivos (Garcia *et al.*, 2025). Contudo, essas formulações não foram testadas para atuar simultaneamente como

adesivos para fixação de próteses removíveis e sistemas de liberação local com atividade antifúngica.

Ao longo dos anos, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a permanência de agentes antifúngicos e antimicrobianos no sítio de colonização por *C. albicans*, buscando superar as limitações das terapias atualmente disponíveis para o tratamento da EP. O aprimoramento de formulações já existentes como vernizes fotopolimerizáveis para resinas de base (Lazarin *et al.*, 2014), géis (Mustafa *et al.*, 2025; Iyer *et al.*, 2022; Tay *et al.*, 2014; Capistrano *et al.*, 2013; Amanlou *et al.*, 2006), reembasadores de prótese (Pachava *et al.*, 2015), materiais de base (Bajunaid *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2016), condicionadores de tecido (Bassi; Boriollo, 2022; Iqbal *et al.*, 2015; Bueno *et al.*, 2015; Falah-Tafti *et al.*, 2010; Urban *et al.*, 2006) e adesivos protéticos (Peralta *et al.*, 2023; Garaicoa *et al.*, 2018; Cartagena *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2021) também já foram considerados. Entre essas estratégias, o adesivo protético tem sido explorado como veículo para carrear agentes antifúngicos e antimicrobianos por diversos autores (Peralta *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2021; Garaicoa *et al.*, 2018; Cartagena *et al.*, 2017), devido à sua capacidade mucoadesiva, auxiliando nas próteses desadaptadas, mas também, pela capacidade de interagirem tanto com a mucosa oral quanto com a superfície da prótese contaminados pela infecção fúngica (Mamatha; Srinivasarao, 2022; Cartagena *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2014).

Recentemente, Meneghetti *et al.* (2024) desenvolveram um creme adesivo protético contendo Nys:βCD e avaliaram suas propriedades físico-químicas, reológicas, mucoadesivas e adesivas sobre resina acrílica, bem como sua atividade antifúngica contra *C. albicans* por meio da formação de halos de inibição. A formulação apresentou predominância do comportamento elástico ($G' > G''$) em diferentes frequências angulares e temperaturas, além de propriedades mucoadesivas e adesividade sobre resina acrílica iguais ou superiores às do adesivo comercial, mantendo a atividade antifúngica. Apesar desses resultados promissores, aspectos relacionados ao perfil de liberação da Nys, à atividade sobre biofilmes de *C. albicans* e à remoção da formulação após o uso permaneciam por investigar.

A associação entre a função adesiva e a disponibilização local de um antifúngico representa uma estratégia promissora para o tratamento da estomatite protética (EP), pois pode favorecer o contato do fármaco com a superfície protética e a mucosa oral, além de proporcionar maior praticidade de aplicação. Adicionalmente, a

ação adesiva pode contribuir para melhorar a retenção e a estabilidade da prótese durante o uso, favorecendo o conforto do paciente, especialmente em casos de retenção reduzida. A possibilidade de prolongar a permanência local do antifúngico também poderia permitir maior intervalo entre as aplicações e, conseqüentemente, favorecer a adesão ao tratamento. Essa abordagem é particularmente relevante diante dos desafios terapêuticos da EP, incluindo sua recorrência e as limitações associadas aos regimes convencionais de administração de antifúngicos (Lombardi; Budtz-Jørgensen, 1993; Martins; Gontijo, 2017; Rai et al., 2022; Almoyad, 2025).

Entretanto, esses potenciais benefícios, especialmente quanto à permanência local do antifúngico e à adesão terapêutica, ainda precisam ser investigados. Nesse sentido, a originalidade desta tese reside na comparação entre cremes adesivos protéticos contendo Nys livre ou complexada à β -ciclodextrina (Nys: β CD), por meio da avaliação integrada do perfil de liberação, da fotoestabilidade, da atividade antifúngica e antibiofilme, da citotoxicidade e da remoção por escovação. Para tanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a liberação do fármaco, as propriedades biológicas e a remoção por escovação dessas formulações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de liberação, a atividade biológica e a remoção por escovação de cremes adesivos protéticos contendo Nys livre (DACNys) ou Nys complexada à β -ciclodextrina (DACNys: β CD).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) desenvolver e validar um método analítico para a quantificação de Nys na forma livre e complexada à β -ciclodextrina (Nys: β CD) por espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis);
- b) determinar o perfil de liberação *in vitro* da Nys a partir dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD, utilizando células de difusão de Franz por até 480 min;
- c) investigar a fotoestabilidade dos cremes adesivos protéticos DACNys e DACNys: β CD após exposição à radiação UV-C por 24, 48, 72 e 168 h, por meio da determinação do teor de Nys e da avaliação das características organolépticas, pH e espalhabilidade;
- d) avaliar a atividade antifúngica contra *Candida albicans* dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD por meio do ensaio de difusão em ágar, com determinação de halos de inibição;
- e) investigar o efeito dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD sobre biofilme de *C. albicans*, por meio dos ensaios de viabilidade metabólica (XTT) e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL);
- f) verificar o efeito dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD sobre biofilme de *C. albicans* formados sobre espécimes de resina acrílica, por meio dos ensaios de viabilidade metabólica (XTT) e análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- g) determinar a citotoxicidade dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD por meio do ensaio de redução do MTT em células de fibroblastos murinos 3T3;

- h) comparar a eficácia de diferentes métodos de remoção por escovação dos cremes adesivos protéticos DACNys e DACNys: β CD da superfície de resina acrílica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESTOMATITE PROTÉTICA E DESAFIOS NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR *C. ALBICANS*

Perić *et al.* (2024) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de atualizar as evidências disponíveis sobre a epidemiologia, etiologia e distribuição global das espécies de *Candida* associadas à estomatite protética (EP). A revisão foi conduzida de acordo com as diretrizes do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA 2020), utilizando buscas nas bases de dados MEDLINE, Web of Science e Scopus, abrangendo estudos publicados nos últimos 20 anos. Foram incluídos estudos observacionais que investigaram usuários de próteses removíveis com diagnóstico de EP ou colonização por *Candida* spp., sendo extraídas informações relacionadas à prevalência da doença, métodos diagnósticos, espécies de *Candida* identificadas, fatores etiológicos e fatores de risco associados ao desenvolvimento da EP. A qualidade metodológica dos estudos foi avaliada por meio das ferramentas de avaliação crítica do Joanna Briggs Institute (JBI). Ao final do processo de seleção, 28 estudos foram incluídos na revisão, totalizando 4.243 participantes. Desses, 21 estudos avaliaram pacientes com EP e sete investigaram a colonização por *Candida* em usuários de próteses removíveis. A prevalência da EP variou de 11% a 70%, sendo mais frequentemente observada em indivíduos idosos usuários de próteses totais removíveis. A revisão demonstrou que a *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada, tanto na mucosa palatina quanto na superfície interna das próteses, embora tenha sido observado aumento na participação de espécies de *Candida não-albicans*, especialmente *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Segundo os autores, essa mudança no perfil microbiológico pode estar relacionada ao uso crescente de antifúngicos, favorecendo a seleção de espécies menos sensíveis às terapias convencionais. Os resultados da revisão evidenciaram que a etiologia da EP é multifatorial. Os principais fatores de risco identificados foram o uso contínuo da prótese, próteses mal adaptadas, tempo prolongado de uso, higiene oral e da prótese inadequadas, acúmulo de biofilme, redução do fluxo salivar, alterações do pH da saliva, tabagismo e doenças sistêmicas. A superfície acrílica das próteses favorece a adesão de *Candida* spp. e a formação de biofilme, o que contribui para a persistência da infecção e aumenta a resistência aos antifúngicos e às medidas convencionais de

higiene. Além disso, o envelhecimento da prótese favorece alterações estruturais que dificultam a remoção do biofilme. Os autores concluíram que a colonização por *Candida* spp. e a formação de biofilme desempenham papel central na patogênese da EP, destacando a importância do controle do biofilme, da adequada higienização das próteses, da substituição de próteses antigas ou mal adaptadas e do acompanhamento clínico periódico dos usuários de próteses removíveis.

3.2 NISTATINA NO TRATAMENTO DA ESTOMATITE PROTÉTICA

Rai *et al.* (2022) conduziram uma revisão sistemática com metanálise, pesquisando as bases PubMed, Cochrane Library e Scopus, com o objetivo de sintetizar a eficácia de diferentes protocolos terapêuticos e o perfil de segurança da nistatina (Nys) no tratamento da candidíase oral em populações distintas de pacientes. A qualidade metodológica dos estudos selecionados foi analisada com base no Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions e no software Review Manager (RevMan) 5.4.1, considerando os riscos de viés de seleção, desempenho, detecção, atrito e relato. Do total de 1.102 resumos rastreados, 24 estudos foram incluídos na revisão, totalizando 1.746 pacientes com idade entre 12 meses e 70 anos, tendo como desfecho principal a cura clínica e/ou micológica. Entre os estudos incluídos, quinze investigaram especificamente a estomatite protética (EP), envolvendo subgrupos com distúrbios respiratórios (um estudo), diabetes mellitus (um estudo), lactentes ou crianças (quatro estudos), infecção pelo HIV ou síndrome da imunodeficiência adquirida (três estudos), pacientes oncológicos hospitalizados (um estudo) e um estudo com paciente apresentando múltiplas condições associadas como: candidíase eritematosa, HIV, xerostomia, transplante de órgãos e estomatite protética. Nesses ensaios, a Nys figurou como grupo controle, comparada a fluconazol, terapia fotodinâmica (TFD), micro-ondas e placebo, entre outras intervenções. As apresentações empregadas incluíram suspensão, gel e pastilha, com dosagens entre 100.000 UI e 1.100.000 UI, administradas de três a cinco vezes ao dia, por 10 a 30 dias. Os autores realizaram também um estudo descritivo sobre a eficácia, os protocolos e a segurança da Nys. Dos 24 artigos analisados, quinze apontaram o uso de prótese dentária como fator de risco, e onze utilizaram Nys na dose de 100.000 UI, de três a quatro vezes ao dia, durante 7 a 30 dias, faixa em que as taxas de cura clínica variaram entre 14,30% e 89,30%, e as de cura micológica entre 30,77% e

71,40%. Por forma farmacêutica, a cura clínica atingiu 89% com solução, 54% com suspensão e 28% com pastilha. O aumento da dose de 200.000–400.000 UI para 500.000 UI elevou a cura clínica para 77% no uso de pastilhas, enquanto a cura micológica com formulações pastosas alcançou 30,7%. As maiores taxas com pastilhas foram observadas em pacientes respiratórios (87%) e em pacientes oncológicos tratados com pastilhas e suspensões combinadas (87,5%; cura micológica de 66% no mesmo grupo, associado à infecção oral por *Candida*). Já os ensaios com lactentes, crianças e pacientes HIV/AIDS tratados com suspensão tiveram desempenho inferior (cura clínica de 9% a 63,5%; cura micológica de 6% a 13%). De modo geral, pastilhas superaram suspensão e solução. Eventos adversos descritos em seis dos estudos foram náusea, vômito, sabor desagradável e diarreia. A metanálise, com cinco estudos comparando suspensões de Nys à TFD, indicou eficácia semelhante entre as duas condutas, apesar do custo elevado da TFD. Os autores concluem que a Nys tópica permanece a base terapêutica da candidíase oral, por sua eficácia, baixo custo e poucos efeitos adversos, sendo Nys e TFD igualmente eficazes na remissão clínica da estomatite protética e na redução da contagem de UFC/mL de *Candida* nas próteses e superfícies palatinas.

Uma revisão sistemática com meta-análise conduzida por Almoyad (2025), seguindo as diretrizes PRISMA e registrada na plataforma INPLASY (registro nº 2024100132), teve como objetivo avaliar a segurança e a eficácia de terapias antifúngicas, tradicionais e emergentes, no tratamento da candidíase oral em usuários de prótese dentária. Para isso, o autor realizou buscas em cinco bases de dados (PubMed, CINAHL, Cochrane Library, Medline e Web of Science), utilizando os termos MeSH que combinavam descritores relacionados à prótese dentária (dentures, complete/partial dentures, dental/removable prosthesis) e à candidíase e aos antifúngicos (oral candida, candidiasis, denture stomatitis, *Candida albicans*, nystatin, fluconazole, miconazole, amphotericin, clotrimazole, ketoconazole, itraconazole, azole antifungal, entre outros). A estrutura PICO orientou a seleção dos estudos, definindo como população pacientes com candidíase oral associada ao uso de prótese, como intervenção o tratamento antifúngico, como comparação as intervenções não farmacológicas e, como desfechos, a segurança e a eficácia do tratamento, a qualidade de vida e a satisfação do paciente. Do total de 2.810 registros inicialmente identificados, após a remoção de duplicatas e a triagem por título e resumo, 69 estudos foram avaliados quanto à elegibilidade, dos quais 24 foram efetivamente

incluídos na revisão, totalizando 1.746 pacientes. O risco de viés dos estudos foi avaliado por meio das ferramentas Robvis 2.0/Cochrane, para os ensaios randomizados, e ROBINS-I, para os estudos não randomizados, tendo ambos os grupos apresentados risco de viés predominantemente baixo. A extração dos dados foi realizada no Excel 2019, e a meta-análise, no software Review Manager (RevMan) 5.4.1, empregando modelo de efeitos aleatórios e razão de chances (odds ratio) para os dados contínuos, por meio de variância inversa. Quanto aos resultados, a nistatina (Nys) mostrou-se superior à terapia fotodinâmica (TFD/PDT) na redução da colonização por *Candida* na região palatina ($p = 0,006$; IC95%: 0,12–0,45; $I^2 = 0\%$), embora ambas as terapias tenham apresentado eficácia comparável na descontaminação da superfície da prótese ($p = 0,57$; IC95%: –0,08–0,14). O fluconazol, por sua vez, alcançou taxa de melhora clínica em curto prazo de 77,8%, mas esteve associado a recidiva significativa após a suspensão do tratamento, com taxas de cura entre 44% e 63% e recorrência relevante já em 12 semanas ($p = 0,02$). A PDT, isoladamente, promoveu reduções de 0,68 a 0,77 log₁₀, valores comparáveis aos obtidos com a Nys (0,57 a 1,43 log₁₀), e a terapia combinada de PDT com Nys melhorou os desfechos em relação à monoterapia. A clorexidina também demonstrou atividade antifúngica significativa ($p < 0,0001$), com a formulação de clorexidina digluconato a 0,12% superando a hexetidina a 0,1% ($p < 0,0001$; IC95%: 0,18–0,49), enquanto miconazol e própolis atingiram taxas de cura clínica de 70%. Em comparação com o extrato de alho, a Nys promoveu maior redução da largura do eritema ($0,08 \pm 0,18$ cm vs. $1,09 \pm 0,18$ cm; $p < 0,001$). Nys e anfotericina B, ainda, apresentaram as maiores taxas de sucesso na redução da adesão de *Candida* às superfícies acrílicas (86,48% e 90,85%, respectivamente), superando os antifúngicos azólicos. Em relação à segurança, a hexetidina foi mais bem tolerada do que o fluconazol, enquanto miconazol e própolis brasileira obtiveram alta aceitação por parte dos pacientes; os efeitos adversos associados ao uso de Nys em bochecho, como náusea, vômito e gosto desagradável foram infrequentes e leves. No que se refere à qualidade de vida, o fluconazol promoveu melhora significativa na qualidade de vida relacionada à saúde bucal ($p = 0,0001$), ao passo que a satisfação do paciente foi maior com própolis e tratamentos à base de alho, apesar de suas taxas de cura microbiológica mais modestas. De modo geral, os antifúngicos tradicionais (Nys, fluconazol e miconazol) reduziram significativamente as contagens de colônias de *Candida* e os sintomas clínicos, com bom desempenho em curto prazo, mas com risco

elevado de recidiva, sobretudo no caso do fluconazol, o que também levanta preocupações quanto ao desenvolvimento de resistência. Já as terapias emergentes, como a PDT e os compostos naturais (*Zataria multiflora*, própolis), mostraram eficácia comparável à dos agentes convencionais, com perfis de segurança favoráveis e boa aceitação por parte dos pacientes, ainda que a recidiva em longo prazo permaneça um desafio. Diante desse cenário, o autor sugere que a combinação de antifúngicos tradicionais com terapias emergentes, associada a uma higienização mecânica e química rigorosa da prótese, pode ampliar a eficácia do tratamento e reduzir as taxas de recidiva.

3.3 ADESIVOS PROTÉTICOS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Os adesivos protéticos têm sido investigados como sistemas de liberação local de agentes terapêuticos, devido à sua capacidade de prolongar o contato do fármaco no sítio de ação. Dessa forma, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para incorporar agentes antifúngicos aos adesivos protéticos, como fármacos livres, micropartículas e nanopartículas, visando potencializar o controle de *Candida albicans* e auxiliar no manejo da estomatite protética.

Cartagena *et al.* (2017) desenvolveram e avaliaram um adesivo protético experimental com atividade antifúngica contendo micropartículas poliméricas de nitrato de miconazol (MN). As micropartículas foram produzidas utilizando os polímeros Eudragit® L-100, Gantrez™ MS-955 ou a combinação de ambos (E, G e EG), sendo posteriormente incorporadas ao adesivo em concentrações de 1% e 2% do fármaco. As formulações foram comparadas a controles contendo MN puro (DAMN) e adesivo sem agente antifúngico (DACT). A atividade antifúngica foi avaliada frente a *C. albicans* por meio da concentração inibitória mínima (CIM, por microdiluição em caldo e diluição em ágar), a resistência adesiva foi determinada por ensaio de tração entre cilindros de resina acrílica (polimetilmetacrilato) imersos em água a 0,5, 1, 3 e 6 h, e a toxicidade foi investigada pelo bioensaio de letalidade em *Artemia salina* (24 e 48 h). Os resultados demonstraram que os adesivos contendo micropartículas de MN apresentaram atividade antifúngica equivalente ou superior à do fármaco livre, com destaque para as formulações contendo Gantrez™ MS-955 isoladamente ou associado ao Eudragit® L-100 (DAEG1, DAG2 e DAEG2, CIM = 1,25 µg/mL). Quanto à força adesiva, houve aumento progressivo até 3 h de imersão, seguido de declínio

até 6 h, sendo que a formulação DAEG2 apresentou o melhor desempenho global, com força adesiva inicial elevada e mantida por até 6 h; formulações contendo apenas Eudragit® L-100 apresentaram força adesiva inferior ao controle. Todos os extratos mostraram toxicidade baixa ou nula frente a *A. salina*, com leve aumento dependente da concentração de MN. Dessa forma, os autores sugeriram que a incorporação de agentes antifúngicos em adesivos protéticos representa uma estratégia promissora para o tratamento tópico da estomatite protética, ressaltando o Gantrez™ MS-955 como o polímero mais favorável tanto para a atividade antimicrobiana quanto para a manutenção da força adesiva.

Garaicoa *et al.* (2018) investigaram a incorporação de diferentes agentes antifúngicos, peptídeos antimicrobianos e lipídios bioativos em um adesivo protético comercial, avaliando sua ação contra *C. albicans* e sua segurança biológica. A atividade antifúngica foi determinada por ensaios de microdiluição, enquanto a citotoxicidade dos cremes adesivos foi avaliada em queratinócitos epiteliais gengivais humanos. Os resultados indicaram que alguns agentes antimicrobianos apresentaram redução da atividade quando incorporados ao adesivo; entretanto, antifúngicos como anfotericina B, clorexidina, fluconazol e nistatina mantiveram sua ação contra *C. albicans*. Além disso, os cremes adesivos contendo os agentes antifúngicos não apresentaram efeito citotóxico significativo. Os autores destacaram que a incorporação de compostos antifúngicos em adesivos protéticos pode representar uma alternativa para aumentar o tempo de contato do fármaco com os tecidos orais e auxiliar no controle da estomatite protética.

Oliveira *et al.* (2021) investigaram a influência da incorporação de nistatina (Nys) e de um antifúngico alternativo, o pirazol, a diferentes adesivos protéticos comerciais quanto à eficácia retentiva, à citotoxicidade e à atividade antimicrobiana frente a *C. albicans*. Os três tipos comerciais de adesivo para prótese dentária avaliados (pó, fita e creme) pertenciam a uma mesma marca (Corega, GlaxoSmithKline, Brentford, Reino Unido). A Nys e o pirazol foram incorporados aos adesivos em três concentrações, 23,78% p/p, 3,02% p/p e 0,31% p/p, que correspondem a 0,015 g, 0,0015 g e 0,00015 g, respectivamente. O estudo compreendeu ensaios de retenção em resina acrílica, avaliações microbiológicas e análise de citotoxicidade. Na avaliação antimicrobiana, adotou-se o método de difusão em ágar, e o crescimento prévio das cepas de *C. albicans* (ATCC 62342) ocorreu em caldo Mueller-Hinton, a 37 °C, durante 48 h. A atividade antifúngica foi estimada a

partir dos halos de inibição do crescimento microbiano e confrontada com a dos grupos controle (adesivo sem antifúngico e adesivo contendo Nys). Realizou-se também o teste de contato direto em diferentes tempos (1, 4, 8 e 12 h), que permitiu estimar a redução da viabilidade microbiana pela contagem de colônias viáveis, com comparação aos controles positivo e negativo. Para a citotoxicidade, o modelo experimental foi a linhagem de fibroblastos de camundongo NIH/3T3, mantida em frascos de cultura contendo DMEM e SFB (37 °C; CO₂). Na sequência, procedeu-se à lavagem e à contagem das células, que foram então ressuspensas em meio DMEM com azul de tripan. No ensaio de MTT, os adesivos foram preparados em DMEM e permaneceram em contato com as células durante 24 h; em seguida, os extratos foram retirados, adicionaram-se MTT e DMSO e procedeu-se à leitura da absorbância. Segundo os resultados, a Nys e o pirazol experimental geraram halos de inibição semelhantes contra *C. albicans*, tanto na difusão em disco quanto no contato direto ($p > 0,05$). De modo geral, a forma comercial do adesivo (pó, creme ou fita) não influenciou a atividade antifúngica ($p > 0,05$); a exceção foi o pirazol em fita, cujo desempenho superou o do creme e o do pó ($p = 0,031$), o que foi atribuído à menor solubilidade da fita, capaz de manter o princípio ativo mais disponível. Em relação à citotoxicidade, Nys e pirazol comportaram-se de forma semelhante nas duas menores concentrações; na maior concentração, porém, o pirazol mostrou-se mais tóxico que a nistatina e foi, inclusive, o material/concentração de maior toxicidade de todo o estudo ($p < 0,05$). Os autores concluíram que os adesivos protéticos podem atuar como sistema de liberação de agentes antifúngicos, que o pirazol potencializou a ação antifúngica contra *C. albicans* sem comprometer a adesão do produto e que a concentração de 1.560 µg (3,02% p/p) ofereceu o melhor equilíbrio entre eficácia antifúngica e menor citotoxicidade, independentemente do tipo comercial de adesivo.

Peralta *et al.* (2023) avaliaram in vitro o efeito antimicrobiano da incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) a um adesivo protético comercial em pó (Corega®) sobre biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos em espécimes de resina acrílica termopolimerizável. Os espécimes foram tratados com as associações adesivo e AgNPs sintetizadas pelos métodos fotoquímico (Ag UV), de Turkevich (Ag Turk) e de síntese verde com extrato de *Glycine max* (Ag Gm), sendo comparados aos grupos contendo apenas adesivo (AD), adesivo associado à nistatina (AD+Nys) e PBS. Após 3, 6 e 12 h de formação do biofilme, foram avaliadas a carga fúngica por contagem de UFC/mL, a atividade metabólica pelo ensaio XTT e a viabilidade celular

por microscopia confocal. As associações contendo AgNPs promoveram redução significativa da carga fúngica e da atividade metabólica do biofilme em comparação ao adesivo isolado e ao PBS. Os cremes adesivos contendo Ag Turk e Ag Gm apresentaram os melhores resultados, com redução da atividade metabólica de aproximadamente 70% após 3 h, mantendo efeito antimicrobiano significativo até 12 h. Além disso, o desempenho desses cremes adesivos foi comparável ao observado para a associação do adesivo com Nys. Os autores concluíram que a incorporação de AgNPs ao adesivo protético, particularmente aquelas sintetizadas pelos métodos de Turkevich e de síntese verde, apresenta potencial para reduzir a formação de biofilmes de *C. albicans* sobre resina acrílica, podendo constituir uma estratégia promissora para o controle da colonização fúngica associada ao uso de próteses removíveis.

Alvim e colaboradores (2024) realizaram um estudo experimental *in vitro* com o objetivo de incorporar nistatina (Nys) a um adesivo protético comercial (Corega Creme®) e avaliar os efeitos dessa associação sobre a formação de biofilme de *C. albicans* e a força adesiva do material. Foram avaliados três grupos: PMMA sem adesivo, PMMA com o adesivo comercial puro e PMMA com o adesivo acrescido de Nys (100.000 UI/g). Para a avaliação microbiológica, corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável, com rugosidade padronizada ($R_a = 3,0 \mu\text{m}$) para simular a superfície interna da prótese, receberam 0,025 g de adesivo, com ou sem Nys, e foram inoculados com *C. albicans* (ATCC 10231; 10^6 UFC/mL). A viabilidade celular foi determinada por contagem de UFC/mL, expressa em $\log_{10}$, após 1,5 h de adesão e 24 h de maturação do biofilme. A força adesiva foi avaliada por ensaio de tração em Máquina Universal de Ensaio EMIC 1000, utilizando pares de cilindros unidos com 0,3 g de adesivo e submetidos a 5 min, 6 h e 12 h de imersão em água destilada a 37 °C. Os dados microbiológicos foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis/Dunn, enquanto a força adesiva foi avaliada por ANOVA de duas vias/Bonferroni, considerando $\alpha = 0,05$. A incorporação de Nys promoveu redução expressiva do biofilme de *C. albicans*. A contagem foi de aproximadamente $8,3 \log_{10}$ UFC/mL nos grupos PMMA sem adesivo e com adesivo comercial puro, sem diferença significativa entre eles, e reduziu-se para $5,01 \log_{10}$ UFC/mL no grupo contendo Nys ($p < 0,001$), correspondendo a uma redução de aproximadamente $3 \log_{10}$. Quanto à força adesiva, não foram observadas diferenças significativas entre o adesivo comercial puro ($9,98 \pm 1,82$ N) e o adesivo modificado com Nys ($10,38 \pm 1,34$ N) na análise geral ($p = 0,226$). Entretanto, após 5 min de aplicação, período em que ambos os grupos apresentaram

os menores valores de força adesiva, o material contendo Nys apresentou força significativamente maior que o adesivo comercial puro ($p = 0,048$). Nos tempos de 6 e 12 h, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$), com aumento progressivo da força adesiva ao longo do período de avaliação. Os autores concluíram que a incorporação de Nys ao adesivo protético reduziu significativamente o acúmulo de biofilme de *C. albicans* sem comprometer a força adesiva do material e, inicialmente, promoveu seu aumento. Esses achados indicam o potencial do adesivo protético como veículo para a liberação local de antifúngicos.

Meneghetti (2024a) desenvolveram um creme adesivo experimental contendo nistatina complexada à β -ciclodextrina (DACNys: β CD) ou nistatina (Nys) em sua forma livre (DACNys), visando ao tratamento da estomatite protética. Inicialmente, foram desenvolvidas dez formulações contendo carboximetilcelulose (CMC) dispersa em água, Gantrez™ MS-955, Versagel®, tri(propilenoglicol) metil éter e vaselinas sólida e líquida. Três formulações foram selecionadas com base em características visuais e táteis e, posteriormente, aprimoradas com conservantes, edulcorantes e flavorizantes, originando os cremes adesivos DAC_1:20, DAC_1:4 e DAC_1:1, correspondentes às diferentes proporções de Gantrez™ MS-955. Essas formulações foram avaliadas quanto à mucoadesão, utilizando mucosa suína, e à adesividade em resina acrílica, tendo o Ultra Corega Creme Sem Sabor® (UCC) como controle. Com base nesses resultados, o DAC_1:20 foi selecionado como formulação-base para incorporação de 36 mg/g de Nys: β CD ou 17,5 mg/g de Nys, originando os cremes DACNys: β CD e DACNys, respectivamente. Os cremes adesivos foram caracterizados quanto às propriedades físico-químicas e mecânicas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), reologia, espalhabilidade, mucoadesão e adesividade em resina acrílica. A atividade antifúngica foi avaliada *in vitro* contra *C. albicans* pelo ensaio de halo de inibição, utilizando DAC_1:20 e UCC como controles. Quando aplicável, os dados foram analisados considerando $\alpha = 0,05$. Os principais achados estão expressos na Tabela 1. Em conjunto, esses achados indicam que a incorporação de Nys ou Nys: β CD conferiu atividade antifúngica às formulações sem comprometer suas propriedades adesivas, destacando seu potencial como alternativa terapêutica para o manejo da estomatite protética.

Tabela 1 – Síntese dos principais resultados da caracterização dos cremes adesivos contendo nistatina ou complexo nistatina:β-ciclodextrina, segundo Meneghetti (2024a)

Propriedade	Resultado principal
Mucoadesão	DACNys e DACNys:βCD > UCC ($p < 0,001$)
Adesividade	DACNys e DACNys:βCD ≥ UCC em todos os tempos ($p < 0,05$); DACNys:βCD com maior efeito nos tempos iniciais (5 min e 3 h), sem diferença frente a DAC_1:20 e DACNys a partir de 6 h
Espalhabilidade	DACNys:βCD e DACNys apresentaram maiores valores que DAC_1:20 e UCC ($p < 0,001$); todas as formulações > 27 mm
Reologia	Formulações experimentais (DAC_1:20, DACNys e DACNys:βCD) com comportamento predominantemente elástico ($G' > G''$; $\tan \delta < 1$) nas três temperaturas; UCC apresentou cruzamento G'/G'' , com predomínio do componente viscoso em frequências mais altas
FTIR	Ausência de alterações significativas após incorporação dos ativos; bandas preservadas, com surgimento de bandas discretas adicionais (3027 cm^{-1} no DACNys; 1404 cm^{-1} no DACNys:βCD)
TGA	Perfis de perda de massa semelhantes entre formulações medicadas e base
Atividade antifúngica	DACNys e DACNys:βCD apresentaram atividade contra <i>C. albicans</i>

* FTIR: infravermelho por transformada de Fourier; TGA: análise termogravimétrica

Fonte: Meneghetti, 2024a.

Dessa forma, este estudo dará continuidade aos estudos com os cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD desenvolvidos por Meneghetti (2024a), cuja os cremes adesivos encontram-se protegida por patente (Meneghetti *et al.*, 2024b, 2024c, 2024d).

3.4 β-CICLODEXTRINA COMO ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACÊUTICAS

Urban *et al.* (2023) desenvolveram e caracterizaram complexos de inclusão de nistatina:β-ciclodextrina (Nys:βCD), avaliando seu potencial antifúngico frente a diferentes espécies de *Candida*. Inicialmente, foi determinada a solubilidade de fase da nistatina (Nys) na presença de β-ciclodextrina, seguida da obtenção dos complexos de inclusão por mistura física, liofilização e secagem por pulverização (*spray-drying*), nas proporções molares 1:1 e 1:2. Os complexos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X. A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo utilizando Nys e Nys:βCD 1:1 obtido por liofilização frente a nove cepas de *Candida spp.*, incluindo *C. albicans*. Além disso, a aplicabilidade do complexo no tratamento da estomatite protética (EP) foi investigada por meio da incorporação de Nys ou Nys:βCD 1:1 liofilizado em corpos de prova de material condicionador de tecido, avaliando-se a

formação de biofilme de *C. albicans* por ensaio de viabilidade metabólica (XTT). Os resultados da curva de solubilidade de Nys:βCD forneceram correlação linear ($R = 0,9817$). Além disso, demonstraram formação dos complexos de inclusão, com redução do caráter cristalino da Nys e obtenção de estruturas predominantemente amorfas, além de alterações nos perfis espectroscópicos e térmicos dos materiais. Os complexos obtidos por liofilização e secagem por pulverização apresentaram maior eficiência de complexação, especialmente na proporção molar 1:1. A complexação da Nys em βCD promoveu aumento da solubilidade, maior eficiência de dissolução e liberação sustentada quando comparada ao fármaco livre. O complexo Nys:βCD 1:1 manteve a atividade antifúngica frente às cepas avaliadas e apresentou capacidade de inibir o crescimento de biofilme de *C. albicans* por até 14 dias, utilizando menor concentração do fármaco quando comparado à Nys livre. Dessa forma, os autores concluíram que a complexação com β-ciclodextrina representa uma estratégia promissora para melhorar as propriedades farmacêuticas da Nys, favorecendo sua aplicação em sistemas de liberação local destinados ao controle de infecções por *Candida* e ao manejo da EP.

Moraes *et al.* (2024) avaliaram a toxicidade *in vitro* e a atividade antifúngica da Nys e clorexidina (Chx), livres e complexadas com β-ciclodextrina (βCD). Os complexos de inclusão Nys:βCD e Chx:βCD foram obtidos pelo método de liofilização, utilizando proporções molares de 1:1 e 1:2, respectivamente. A toxicidade dos compostos foi inicialmente avaliada pelo bioensaio com *A. salina*, enquanto a atividade antifúngica frente a *C. albicans* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo para obtenção das concentrações inibitórias mínimas (CIM). Além disso, a citotoxicidade foi investigada em células por meio dos ensaios de MTT e vermelho neutro (NR), associados à análise morfológica celular. Os resultados demonstraram que os antifúngicos complexados com βCD apresentaram menor toxicidade em comparação às formas livres no bioensaio com *A. salina*. As CIMs obtidas foram de 0,5 mg/L para Nys, 4 mg/L para Nys:βCD, 4 mg/L para Chx e 8 mg/L para Chx:βCD. A clorexidina livre apresentou maior efeito citotóxico e alterações morfológicas celulares, enquanto os demais grupos mantiveram viabilidade celular superior a 70%. Os autores concluíram que a complexação com βCD pode reduzir a toxicidade dos agentes antifúngicos, mantendo sua atividade contra *C. albicans*, representando uma estratégia promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação mais biocompatíveis para o tratamento de infecções fúngicas.

3.5 AVALIAÇÃO ANALÍTICA E FARMACÊUTICA DE FORMULAÇÕES CONTENDO NISTATINA

Hemmateenejad *et al.* (2014) investigaram a fotodegradação da Nys por espectrofotometria UV-Vis, utilizando soluções etanólicas do fármaco expostas à radiação UV (366 nm) em diferentes tempos de irradiação. As alterações nos espectros de absorbância foram analisadas por métodos quimiométricos, incluindo análise de componentes principais e resolução de curvas multivariadas por mínimos quadrados alternados (MCR-ALS), permitindo identificar as espécies químicas formadas durante o processo de degradação. Os resultados demonstraram a presença de três espécies absorventes no sistema, correspondentes à nistatina (Nys) e dois produtos de degradação. A análise dos perfis de concentração indicou que a fotodegradação ocorre em duas etapas consecutivas ($A \rightarrow B \rightarrow C$), nas quais a Nys é inicialmente convertida em um produto intermediário, que posteriormente sofre degradação adicional. A modelagem cinética indicou comportamento de primeira ordem na primeira etapa e de ordem zero na segunda etapa, com constantes de velocidade de $0,0929 \pm 0,0076/\text{min}$ e $0,0052 \pm 0,0016/\text{min}$, respectivamente. Os autores concluíram que a espectrofotometria UV-Vis associada à análise quimiométrica foi uma ferramenta eficiente para monitorar a estabilidade da Nys e caracterizar seu processo de fotodegradação, reforçando a importância do controle da exposição à luz durante análises e desenvolvimento de formulações contendo esse antifúngico.

Mustafa *et al.* (2025) desenvolveram e avaliaram um gel novassomal carregado com nistatina (Nys) para o tratamento tópico de infecções por *Candida albicans*. Os novassomos, vesículas lipídicas multilamelares de fase interna elevada, foram preparados por injeção de etanol modificada, combinando ácido esteárico, ácido oleico, Span 60 e colesterol. A suspensão resultante foi incorporada a uma base de Carbopol, originando nove formulações (F1–F9) com proporções variadas de excipientes. Os géis foram então caracterizados fisicoquimicamente quanto a eficiência de encapsulação, pH, viscosidade/reologia, tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, comportamento térmico (DSC/TGA), compatibilidade química (FTIR), morfologia (SEM) e cristalinidade (XRD). Em seguida, a estabilidade dos géis foi avaliada armazenando os cremes adesivos por 30 dias em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C), com medições de pH, viscosidade, eficiência de

encapsulação e aparência física nos dias 0, 15 e 30. Paralelamente, foi estabelecida uma curva de calibração por espectrofotometria UV-Visível (Shimadzu UV-1800), com a Nys dissolvida em PBS/DMSO e lida a 304 nm, na faixa de 2 a 12 µg/mL, validada conforme as diretrizes ICH. A liberação foi avaliada utilizando célula de difusão de Franz, com a suspensão do gel no compartimento doador e 15 mL de PBS (pH 7,4) no compartimento receptor, mantidos a $37 \pm 0,5$ °C sob agitação durante 12 h. Os compartimentos foram separados por uma membrana de diálise celulósica. Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos de 0,5, 1, 2, 4, 6 e 12 h, com reposição do volume por PBS fresco, e analisadas por espectrofotometria a 304 nm. Os dados de liberação foram ajustados aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer–Peppas. Por fim, a atividade antifúngica foi avaliada por ensaio de halo de inibição em ágar e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a *C. albicans*, enquanto a segurança dérmica foi investigada *in vivo* em ratos por meio do teste de Draize.

Os resultados mostraram que nos estudos de estabilidade, os géis permaneceram estáveis nas duas condições de armazenamento avaliadas, sem alterações significativas nos parâmetros analisados ao longo dos 30 dias ($p > 0,05$). O pH manteve-se entre 6,83 e 6,89, a viscosidade variou de 4295 a 4325 cP e a eficiência de encapsulação permaneceu entre 79,1% e 80,9%, sem evidências de separação de fases, alteração de cor ou precipitação. O método de quantificação por UV-Vis apresentou excelente linearidade na faixa de 2 a 12 µg/mL ($R^2 = 0,9999$), com limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão dentro dos critérios estabelecidos pelo ICH. Quanto à liberação, todas as formulações apresentaram perfil sustentado ao longo das 12 h, sendo que a maioria atingiu aproximadamente 80% de fármaco liberado até 10 h, com exceção de F7. A formulação F6 apresentou a maior liberação acumulada (93,2%), sendo superior a F1, F3 e F7 a partir de 4 h ($p < 0,05$). Os dados apresentaram melhor ajuste aos modelos de ordem zero e Higuchi, enquanto os valores do expoente de Korsmeyer–Peppas (0,73–0,89) indicaram transporte não fickiano, compatível com a contribuição simultânea da difusão do fármaco e do relaxamento da matriz polimérica. Em conjunto, os autores concluíram que o gel novassomal contendo Nys apresenta potencial para o tratamento tópico da candidíase, associando liberação sustentada, atividade antifúngica e adequada tolerabilidade dérmica. Ressaltaram, contudo, a necessidade de estudos de

estabilidade em longo prazo e de investigação clínica para confirmar sua aplicabilidade terapêutica (Mustafa *et al.*, 2025).

Garcia *et al.* (2025) desenvolveram e caracterizaram hidrogéis mucoadesivos contendo os complexos de inclusão nistatina: β -ciclodextrina (Nys: β CD) e clorexidina: β -ciclodextrina (Chx: β CD), avaliando suas propriedades físico-químicas por análises *in vitro* e *ex vivo*, além da atividade antifúngica contra *Candida albicans*, visando aplicação bucal sítio-específica. Os hidrogéis foram formados por uma rede polimérica interpenetrante de quitosana (CS, 2%) e hidroxietilcelulose (HEC/Natrosol, 6%), testando-se as proporções CS:HEC 1:1, 1:3 e 1:9; a proporção 1:3 foi selecionada por sua consistência de gel. Nela foram incorporados Nys (17,5 mg/g), Chx (64 mg/g), Nys: β CD (36 mg/g) e Chx: β CD (26 mg/g) isoladamente, além de um grupo controle sem fármaco. A liberação *in vitro* foi conduzida em células de difusão de Franz com membrana de acetato de celulose, com coletas em 30, 60, 120, 180 e 240 min, quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Nys a 305 nm; Chx a 258 nm). Para a permeação *ex vivo*, repetiu-se o protocolo substituindo a membrana sintética por mucosa oral suína. A atividade antifúngica foi determinada por CIM (microdiluição em caldo, método EUCAST) e por teste de difusão em ágar (halos de inibição) frente a *C. albicans* SC5314. Na liberação *in vitro* em 4 h, o hidrogel com Nys: β CD liberou cerca de 95 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Nys, contra $\sim 62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ do fármaco não complexado (1,5 vez maior); para a Chx, o hidrogel com Chx: β CD liberou cerca de 800 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, frente a $\sim 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ do fármaco livre (4 vezes maior). Na permeação *ex vivo* pela mucosa suína, a Nys não complexada não foi detectada no meio receptor, enquanto a Nys: β CD permeou cerca de 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ já em 30 min, mantendo-se estável até 4 h; a Chx complexada permeou mais que a não complexada (cerca de 120 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra valores menores). No teste de halos de inibição, o grupo controle não formou halo, enquanto Nys, Chx, Nys: β CD e Chx: β CD formaram halos com medianas de 8, 6, 7 e 5 mm, respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos com fármaco. A complexação com β -ciclodextrina melhorou a solubilidade e a liberação de ambos os fármacos, tanto as formulações não complexadas quanto as complexadas com β -ciclodextrina foram eficazes contra o crescimento de *C. albicans*.

3.6 REMOÇÃO DE CREMES ADESIVOS PROTÉTICOS

Costa *et al.* (2022) avaliaram o efeito de diferentes formas de adesivos para prótese total (creme, tira e pó) sobre a formação de biofilme multiespécies e sobre a força adesiva, além de testar a eficácia de diferentes protocolos de higiene na remoção desses adesivos, partindo da hipótese nula de que o tipo de adesivo não influenciaria a formação de biofilme, a força adesiva, nem a eficácia dos protocolos de higienização. Para isso, os autores confeccionaram corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável (polimetilmetacrilato), divididos em quatro grupos: controle (sem adesivo), Ultra Corega Creme (UCC), Corega Tiras Adesivas (CSA) e Ultra Corega Pó (UCP). O estudo avaliou diferentes apresentações comerciais de adesivos protéticos quanto à formação de biofilme, à eficácia de remoção e à força adesiva. Inicialmente, foi desenvolvido um biofilme estático multiespécies de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* sobre os corpos de prova. A formação do biofilme foi quantificada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), expressa em $\log_{10}$, e avaliada qualitativamente por microscopia de fluorescência utilizando o sistema LIVE/DEAD. A remoção dos adesivos foi investigada por meio de cinco protocolos de higiene: escovação com água destilada, escovação com sabonete Protex, escovação com creme dental Colgate, imersão em solução de comprimidos Corega (CCT) e imersão em CCT seguida de escovação com a própria solução. A quantidade de adesivo remanescente foi determinada pela coloração dos resíduos e análise da área coberta por meio do software ImageJ. A força adesiva foi determinada por ensaio de tração utilizando uma máquina universal de ensaios (EMIC 1000), com pares de cilindros de resina acrílica unidos pelos diferentes adesivos. As avaliações foram realizadas após 5 min, 3, 6, 12 e 24 h. Os resultados microbiológicos demonstraram que as diferentes apresentações comerciais favoreceram a formação de biofilme em comparação ao grupo controle. Os adesivos em tira e em pó aumentaram a formação de biofilme de *C. albicans* ($p = 0,007$ e $p = 0,001$, respectivamente), enquanto as apresentações em creme e em pó favoreceram a formação de *P. aeruginosa* ($p < 0,001$). O adesivo em tira também promoveu maior formação de *S. aureus* ($p < 0,001$). Esses achados foram corroborados pela análise por microscopia de fluorescência. Os principais resultados do ensaio de remoção dos adesivos estão apresentados na Tabela 2. Quanto à força adesiva, o UCP apresentou os maiores valores entre os grupos avaliados ($p < 0,05$).

Entre as diferentes apresentações comerciais, foram observadas diferenças apenas nos períodos de 5 min, quando o CSA apresentou menor força adesiva, e de 3 h, quando o UCC apresentou menor valor. Apenas o CSA apresentou variação significativa ao longo do tempo, com maior força após 3 h em comparação a 5 min ($p = 0,011$) e 24 h ($p = 0,034$). Em conjunto, os autores observaram que todas as apresentações comerciais apresentaram capacidade satisfatória de retenção das próteses removíveis. Entretanto, considerando o favorecimento da formação de biofilme e a presença de resíduos de adesivo, os achados reforçam a importância da higiene mecânica diária para sua remoção e para o controle do biofilme.

Tabela 2 – Principais resultados do ensaio de remoção de adesivos protéticos comerciais

Protocolo de higiene	UCC	CSA	UCP	Interpretação
Escovação + creme dental Colgate	2,30%	2,16%	1,02%	Alta eficácia de remoção
Escovação + sabonete Protex	2,18%	2,71%	1,96%	Alta eficácia de remoção
CCT + escovação	4,72%	5,68%	6,05%	Alta eficácia de remoção
Escovação + água destilada	22,29%	7,67%	28,06%	Eficácia intermediária
Imersão em CCT	85,04%	94,14%	93,79%	Baixa eficácia de remoção

*UCC: Ultra Corega Cream; CSA: Corega Tira Adesiva; UCP: Ultra Corega em Pó; CCT: Corega Tables. Os valores representam a mediana (IC 95%) da área de superfície coberta por adesivo remanescente; quanto menor o percentual, maior a eficácia de remoção. Fonte: *Costa et al., 2022*.

3.7 ADESIVOS PROTÉTICOS

Rosa et al. (2015) realizaram uma revisão sistemática associada ao monitoramento tecnológico de adesivos para prótese dentária, com o objetivo de caracterizar o desenvolvimento científico e tecnológico desses materiais por meio da análise integrada de artigos científicos e patentes. A busca, conduzida segundo as diretrizes PRISMA, contemplou sete bases científicas e diferentes bases de patentes, abrangendo publicações entre 1960 e 2014. Na análise final, foram incluídos 54 artigos e 78 patentes, embora os autores apresentem pequenas variações nesses números em diferentes seções do estudo. Os adesivos foram classificados quanto à composição química em solúveis e insolúveis. Os solúveis compreendem sais poliméricos, como carboximetilcelulose (CMC), associada a ação de curta duração, e polivinil éter-anidrido maleico (PVM-MA), de maior duração. Os insolúveis são apresentados principalmente na forma de fitas ou lâminas impregnadas com o componente ativo. Entre as formas de apresentação avaliadas, creme/pasta (53%) e pó (30%) foram as mais investigadas, seguidas por tiras (9%) e almofadas (8%). Quanto às características dos estudos, 56% foram conduzidos *in vivo*, incluindo

ensaios clínicos e modelos animais. Os Estados Unidos apresentaram a maior participação na produção científica e tecnológica, concentrando 63% das patentes e 33% dos artigos, com destaque para Procter & Gamble e GlaxoSmithKline como principais depositantes. Observou-se ainda expressivo crescimento das pesquisas e do desenvolvimento tecnológico a partir da década de 1990. Os autores destacaram a retirada de adesivos contendo zinco do mercado em razão da associação entre seu uso crônico e alterações neurológicas relacionadas à deficiência de cobre, além de apontarem como perspectivas o desenvolvimento de formulações com agentes antimicrobianos ou antifúngicos e o emprego desses materiais como sistemas de liberação de fármacos. Nesse contexto, os autores ressaltaram o potencial dos adesivos modificados para o manejo de infecções fúngicas em usuários de próteses, particularmente aqueles suscetíveis à candidíase.

Lasica et al. (2025) realizaram uma revisão sistemática sobre a biocompatibilidade de adesivos para prótese dentária, com o objetivo de avaliar seus efeitos sobre a citotoxicidade em fibroblastos orais, a formação de biofilme e infecções microbianas, bem como a indução de respostas inflamatórias nos tecidos orais. A busca, conduzida segundo as diretrizes PRISMA, foi realizada nas bases MedLine/PubMed e Scopus, utilizando termos relacionados a adesivos para prótese, próteses totais, citotoxicidade, inflamação e formação de biofilme. Foram considerados artigos revisados por pares, publicados em inglês entre 2015 e 2025, resultando em 74 estudos incluídos após a triagem. Em relação à citotoxicidade, os autores identificaram evidências de redução da viabilidade de fibroblastos da mucosa oral associada a diferentes adesivos comerciais, com efeitos dependentes da composição, concentração e tempo de exposição. Formulações contendo sais de zinco apresentaram maior redução da viabilidade celular e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto componentes como propilparabeno e benzoato de metila também foram relacionados a efeitos citotóxicos. Foram ainda relatados casos clínicos de alterações sistêmicas associadas ao uso prolongado de adesivos contendo zinco, incluindo hiperzincemia e hipocupremia. Quanto ao biofilme, *Candida albicans* foi o microrganismo mais frequentemente relacionado ao uso de adesivos, em associação com a estomatite protética, seguido por espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Fusobacterium*. Entretanto, os resultados foram inconsistentes: enquanto alguns estudos *in vivo* não observaram alterações significativas na formação do biofilme após 14 a 60 dias de uso, estudos *in vitro*

demonstraram aumento do crescimento fúngico e da adesão de *C. albicans* em determinadas formulações. A resposta inflamatória foi o aspecto menos investigado, sendo identificado apenas um estudo *in vitro* que avaliou a liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por queratinócitos orais. Cremes e pós promoveram maior liberação de citocinas após exposição prolongada, enquanto as tiras não apresentaram esse efeito. Embora os resultados sobre a biocompatibilidade dos adesivos sejam heterogêneos, determinadas formulações podem apresentar efeitos citotóxicos, favorecer a colonização microbiana e induzir respostas inflamatórias, especialmente sob condições de exposição prolongada. Nesse contexto, a composição dos adesivos constitui um fator relevante não apenas para suas propriedades adesivas, mas também para sua biocompatibilidade e interação com o ambiente oral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Neste estudo, foram avaliados cremes adesivos experimentais previamente desenvolvidos e caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas e mecânicas (Meneghetti, 2024a), incluindo o creme adesivo experimental contendo nistatina (DACNys) e o creme adesivo experimental contendo o complexo de inclusão nistatina: β -ciclodextrina (DACNys: β CD). Como controle, foi utilizado o creme adesivo experimental sem fármaco (DAC), e, como controle comercial, o Ultra Corega Creme Sem Sabor® (UCC). Em alguns experimentos, a suspensão oral de nistatina (NysOS; 100.000 UI/mL; Laboratório Teuto Brasileiro S/A) foi empregada como controle biológico. A composição qualitativa dos cremes adesivos encontra-se descrita no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição dos cremes adesivos experimentais para prótese (DACNys, DACNys: β CD, DAC), do controle comercial UCC e da suspensão oral de nistatina

Adesivo	Composição
DACNys	Água destilada, Versagel®, vaselina sólida, carboximetilcelulose (CMC), éter metílico de tri(propilenoglicol) (TPME), Gantrez®, polissorbato (Tween® 80), nistatina, ciclamato de sódio, mentol, metabissulfito de sódio e BHT.
DACNys: β CD	Água destilada, Versagel®, vaselina sólida, carboximetilcelulose (CMC), éter metílico de tri(propilenoglicol), Gantrez®, polissorbato (Tween® 80), complexo nistatina: β -ciclodextrina, ciclamato de sódio, mentol, metabissulfito de sódio e BHT.
DAC	Água destilada, Versagel®, vaselina sólida, carboximetilcelulose (CMC), éter metílico de tri(propilenoglicol) (TPME), Gantrez®, polissorbato (Tween® 80), ciclamato de sódio, mentol, metabissulfito de sódio e BHT.
Ultra Corega Creme Sem Sabor®	Sais de sódio/cálcio de poli(metil vinil éter/ácido maleico), carboximetilcelulose, óleo mineral e vaselina.
Suspensão oral de nistatina	Água de osmose reversa, carmelose sódica, glicerina, sacarina sódica, ciclamato de sódio, álcool etílico, metilparabeno, metabissulfito de sódio, propilparabeno, hidróxido de sódio, aroma de cereja e nistatina.

Fonte: A autora.

4.1.1 Confecção dos cremes adesivos

Os cremes adesivos experimentais foram obtidos por meio da confecção separada das fases aquosa e oleosa, seguida de uma emulsificação, conforme descrito por Meneghetti (2024a). Na fase aquosa, utilizou-se o metabissulfito de sódio

(Delaware, RS, Brasil), o ciclamato de sódio (Sigma-Aldrich, MO, EUA), a água destilada e os polímeros Gantrez[®] (ISP, Wilmington, EUA) e carboximetilcelulose sódica (Aqualon[™] CMC 7MF, Ashland, DE, EUA), todos submetidos à agitação magnética até completa solubilização e adequada dispersão dos polímeros. A fase oleosa, composta por Versagel[®] (base gel oleosa; TKB Trading LLC, Estados Unidos), vaselina sólida (Fleming Manipulações, PR, Brasil), éter metílico de tri(propilenoglicol) (TPME; Sigma-Aldrich, Alemanha), BHT (Delaware, RS, Brasil) e mentol (Delaware, RS, Brasil), foi homogeneizada até a obtenção de uma mistura uniforme. Após o preparo individual das fases, o Tween[®] 80 (Neon, SP, Brasil) e a fase aquosa foram adicionados na fase oleosa, homogeneizados manualmente e submetidos à emulsificação em equipamento SpeedMixer (DAC 150.1 FV SpeedMixer; Flacktek, Landrum, SC, EUA; 2.400 rpm; 3 min) (Figura 1 a), resultando na formação da base do creme adesivo (Figura 1 b).

Figura 1 – a) Homogeneização das fases oleosa e aquosa no equipamento SpeedMixer; b) Resultado do creme adesivo após emulsionado

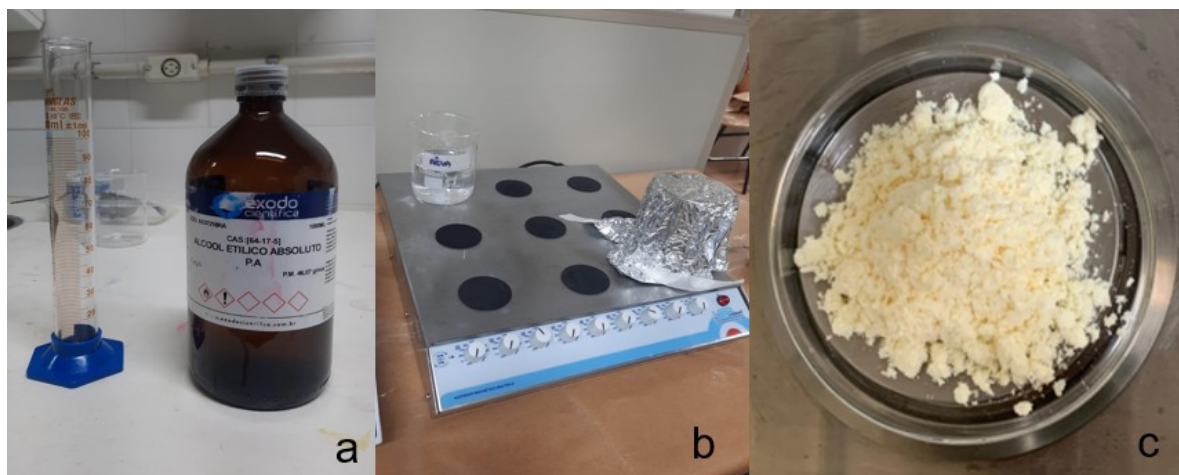


Fonte: A autora.

Complexos de inclusão foram preparados conforme descrito por Urban *et al.* (2023). A β -ciclodextrina foi dissolvida em água destilada sob agitação magnética até completa solubilização, enquanto a Nys (teor 6692,12 UI/mg, lote: 4011824, nº CAS: 1400-61-9, Alemanha, fornecedor: Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR, Brasil) foi previamente solubilizada em etanol (Êxodo Científica, São Paulo, SP, Brasil) e mantida protegida da luz (Figura 2 a-b). Em seguida, a solução de Nys foi adicionada lentamente à solução de β -ciclodextrina, permanecendo sob agitação contínua por 24 h. Após esse período, o sistema foi submetido à evaporação rotativa a 60 °C para

remoção do solvente, seguida de congelamento a -80°C e posterior liofilização por 72 h, resultando na obtenção do complexo de inclusão Nys: β CD (Figura 2 c).

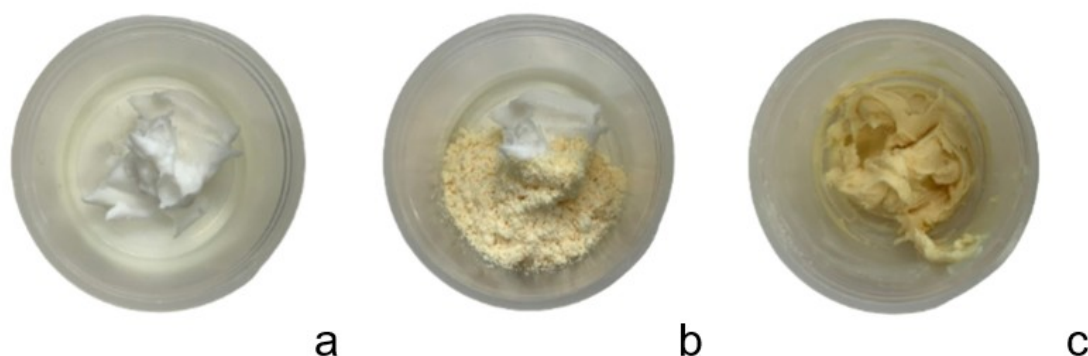
Figura 2 – a) Quantificação precisa do etanol; b) Agitação contínua das soluções de β -ciclodextrina e de Nys em agitador magnético; c) Aspecto físico final do complexo Nys: β CD após liofilização



Fonte: A autora.

O fármaco, na forma pura ou complexada, foi incorporado ao creme adesivo experimental base (DAC) (Figura 3 a–c), em concentrações previamente estabelecidas em estudos anteriores 17,5 mg/g de Nys e 36 mg/g de Nys: β CD (Meneghetti, 2024a; Garcia *et al.*, 2025), utilizando o equipamento SpeedMixer (2400 rpm; 3 min).

Figura 3 – a) Creme adesivo experimental base (DAC); b) DAC e complexo Nys: β CD antes da homogeneização; c) Após homogeneizado, aspecto final do DACNys: β CD



Fonte: A autora.

4.2 MÉTODOS

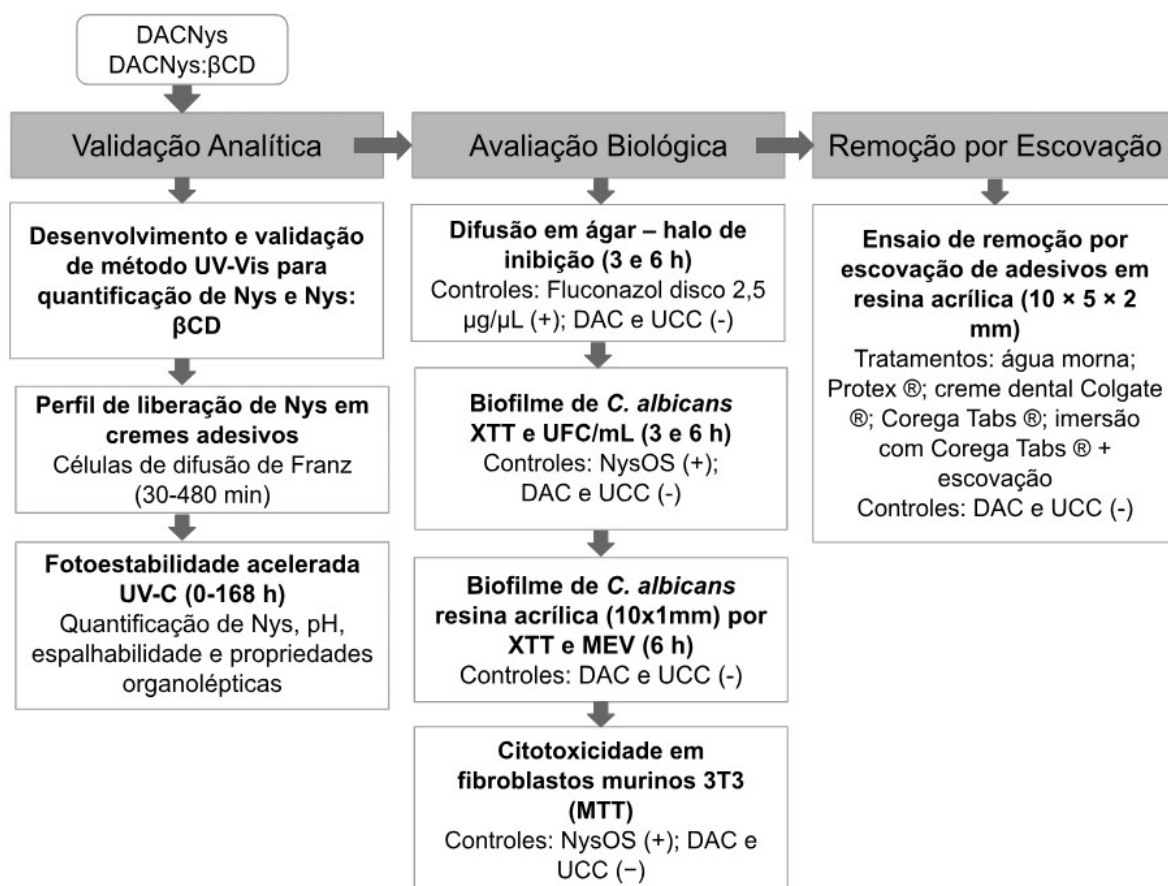
Foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico no ultravioleta-visível (UV-Vis) para a quantificação da nistatina (Nys) em sua forma livre ou

complexada a Nys: β CD. Além disso, foram avaliados o perfil de liberação da Nys a partir dos cremes adesivos, utilizando células de difusão de Franz (30–480 min), e a fotoestabilidade acelerada dos cremes adesivos experimentais sob radiação UV-C (0–168 h), com quantificação de Nys, pH, espalhabilidade e propriedades organolépticas.

Na avaliação biológica, DACNys e DACNys: β CD foram submetidas ao teste de difusão em ágar (halo de inibição; 3 e 6 h) utilizando disco de fluconazol 2,5 μ g/ μ L como controle positivo e DAC e UCC como controle negativo. Posteriormente, foi realizada a quantificação do biofilme de *C. albicans* por meio dos métodos XTT e UFC/mL (3 e 6 h), utilizando NysOS como controle positivo e DAC e UCC como controles negativos. Em espécimes de resina acrílica (10 $\times$ 1 mm), o biofilme também foi analisado por XTT e MEV (6 h), utilizando DAC e UCC como controle negativo. Além disso, a citotoxicidade foi avaliada em fibroblastos murinos 3T3 por meio do ensaio de MTT, tendo NysOS como controle positivo e DAC e UCC como controles negativos.

Por fim, foi analisada a remoção de adesivos por escovação em espécimes de resina acrílica (10 $\times$ 5 $\times$ 2 mm), comparando os grupos água morna, sabonete Protex®, creme dental Colgate®, Corega Tabs® e imersão em Corega Tabs® seguida de escovação, utilizando DAC e UCC como controle negativo. A Figura 4 apresenta o delineamento experimental do estudo.

Figura 4 – Delineamento experimental do estudo



*Nys: Nistatina; Nys:βCD: Complexo de inclusão de nistatina com β-ciclodextrina; UV-Vis: Espectroscopia no ultravioleta-visível; DAC: Creme adesivo experimental; UCC: Ultra Corega Creme Sem Sabor ®; NysOS: Suspensão Oral de Nistatina; UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro; XTT: Ensaio colorimétrico de atividade metabólica celular; MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura; 3T3: Linha celular de fibroblastos murinos; MTT: Ensaio de viabilidade celular baseado na atividade mitocondrial. Fonte: A autora.

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico (UV-Vis) para quantificação de Nys livre ou complexada

Para a quantificação da Nys, foi preparada uma solução estoque de Nys livre na concentração de 500 µg/mL, por meio da dissolução de 5 mg do fármaco em balão volumétrico de 10 mL contendo metanol. A solução foi submetida à sonicação por 5 min para completa dissolução e, posteriormente, filtrada em membrana de 0,22 µm. A partir da solução estoque, foram preparadas diluições sucessivas em solução hidroalcoólica contendo 10% de etanol absoluto em água deionizada (v/v), obtendo-se soluções padrão nas concentrações de 1, 2, 4, 5, 8 e 10 µg/mL. O mesmo procedimento analítico foi empregado para a quantificação do complexo de inclusão

Nys: β CD, utilizando-se concentrações equivalentes de Nys. Para isso, 0,0111 g do complexo foi pesado e solubilizado nas mesmas condições descritas anteriormente.

As amostras foram analisadas em UV-Vis, utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Japão), com cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata. Uma curva de calibração foi construída para Nys e outra para Nys: β CD com base nos valores médios de absorbância em função da concentração, sendo a equação da reta obtida por regressão linear. A linearidade do método foi avaliada por meio do coeficiente de coeficiente de correlação (R). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 305 nm, correspondente a um dos máximos de absorção da Nys na região do UV (Brescansin *et al.*, 2013), comprimento de onda também empregado na detecção da Nys por CLAE (Garcia *et al.*, 2025).

A validação do método foi conduzida de acordo com os parâmetros analíticos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme a RDC nº 166/2017 e o Guia nº 10/2017 (Brasil, 2017a, 2017b), além das recomendações internacionais do ICH Q2(R2). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, homoscedasticidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez.

A seletividade foi determinada por meio da comparação dos espectros de absorbância da Nys com os dos excipientes e do meio, a fim de verificar possíveis interferências no comprimento de onda de análise. A linearidade e a homoscedasticidade foram avaliadas a partir da construção da curva analítica e do coeficiente de correlação (R), sendo a adequação do modelo de regressão linear confirmada pelo teste de normalidade de Shapiro–Wilk e pelo teste de Cochran, utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias.

A precisão foi determinada em termos de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), por meio da análise de amostras em triplicata, com os resultados expressos como desvio padrão relativo (DPR%). A exatidão foi avaliada por testes de recuperação em concentrações conhecidas do fármaco nos níveis: baixo (3 μ g/mL), médio (6 μ g/mL) e alto (9 μ g/mL), verificando-se a proximidade entre os valores medidos e os valores reais.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com utilizando-se do valor de inclinação da curva de calibração (coeficiente angular), obtido

pelo teste de linearidade, e o desvio padrão residual da linha de regressão. Então, aplicam-se as equações 1 e 2:

(1)

(2)

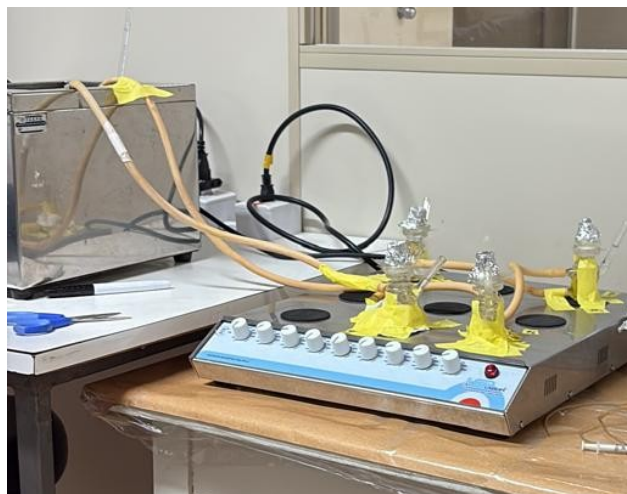
*onde σ é o desvio padrão residual da linha de regressão e IC é a inclinação da curva de calibração (Brasil, 2017b).

Por fim, a robustez foi avaliada mediante pequenas variações nos parâmetros do método, incluindo a análise das soluções após 24 h de preparo, em ambos os casos, além de variações no solvente com adição de 5% de etanol para a Nys livre e a utilização de diferentes lotes do complexo Nys: β CD. Essas modificações foram realizadas com o objetivo de verificar a capacidade do método em manter sua confiabilidade frente a pequenas alterações operacionais. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de teste de Shapiro-Wilk, a fim de confirmar a adequação do modelo de regressão linear.

4.2.2 Liberação *in vitro* de Nys livre ou complexa a partir dos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD

O perfil de liberação *in vitro* da Nys nos cremes desenvolvidos foi avaliado seguindo a metodologia de Garcia et al. (2025), utilizando células de difusão vertical do tipo Franz, empregadas como modelo experimental para simular a difusão do fármaco através de uma barreira semipermeável sob condições controladas (37 °C; agitação do meio receptor; Figura 5). Para isso, foram utilizadas membranas sintéticas de acetato de celulose (14.000 Da; 2,5 cm × 2,5 cm; Sigma-Aldrich, EUA), devido à sua reprodutibilidade e à capacidade de avaliar a liberação do fármaco a partir da formulação sem interferências biológicas.

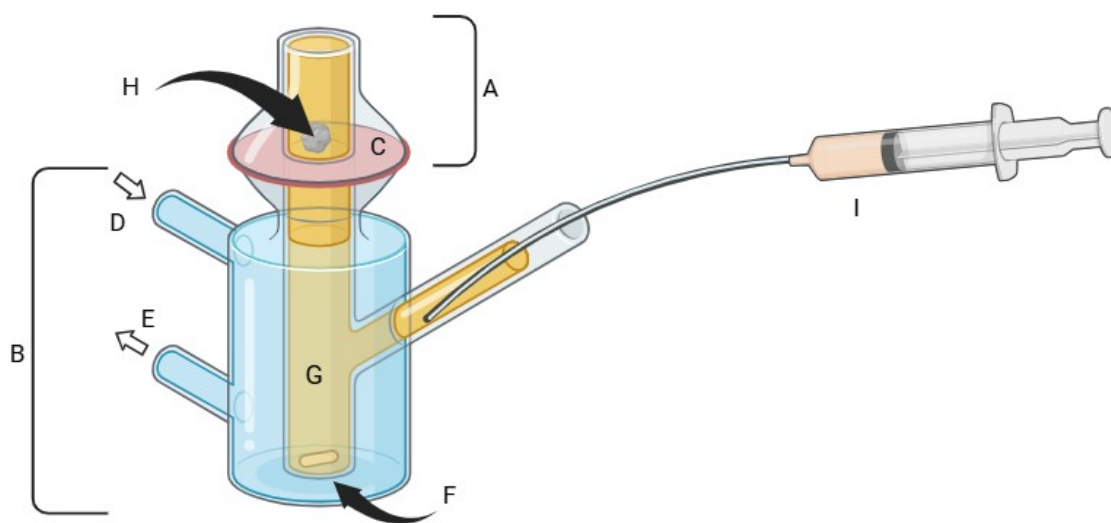
Figura 5 – Sistema de células de difusão vertical de Franz empregado nos ensaios de liberação *in vitro*, sob agitação contínua e controle térmico a 37 °C



Fonte: A autora.

As membranas foram posicionadas entre os compartimentos doador e receptor das células de difusão vertical de Franz, com diâmetro efetivo de difusão de 1,5 cm. Uma das faces da membrana permaneceu em contato com o meio receptor, enquanto a outra foi mantida em contato direto com a formulação adesiva (0,2 g; Figura 6). Como meio receptor, utilizou-se solução hidroalcolica a 10% (v/v), empregada para os grupos DACNys e DACNys:βCD. O volume do compartimento receptor foi de 10 mL, mantido constante ao longo de todo o ensaio (Garcia *et al.*, 2025).

Figura 6 – Desenho esquemático da célula de difusão vertical de Franz utilizada no ensaio de liberação *in vitro*



A: compartimento doador; B: compartimento receptor; C: membrana sintética de acetato de celulose; D: entrada de água a 37 °C; E: saída de água; F: barra magnética de agitação; G: meio receptor (contendo 10 mL de solução hidroalcoólica a 10%); H: 0,2 g de creme adesivo; I: seringa utilizada para coleta das alíquotas nos respectivos tempos de análise, com reposição do meio hidroalcoólico no compartimento receptor. Fonte: A autora, criado em <https://BioRender.com>.

As amostras foram coletadas nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 min, sendo retirado 1 mL do meio receptor em cada ponto de coleta e imediatamente repostado com igual volume de solução hidroalcoólica 10% (v/v), a fim de manter as condições de equilíbrio do sistema. Cada formulação foi testada em triplicata, em três ocasiões diferentes e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (Garcia *et al.*, 2025). A quantificação do fármaco liberado pelos cremes adesivos foi realizada por espectrofotometria UV-Vis, utilizando cubetas de vidro. As amostras foram diluídas quando necessário e analisadas em comprimento de onda de 305 nm. Para a determinação das concentrações, foram utilizadas curvas de calibração específicas para Nys e para o complexo Nys: β CD.

Os dados de liberação acumulada foram ajustados aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer–Peppas e Weibull, utilizando o software DDSolver (Microsoft Excel; Zhang *et al.*, 2010), para caracterização do mecanismo de liberação. A análise estatística foi realizada no software Jamovi (versão 2.6.13.0), empregando-se análise de variância (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.2.3 Fotoestabilidade

Foi realizado um estudo de fotoestabilidade acelerado com base nos princípios gerais da diretriz ICH Q1B farmacêuticos (ICH, 1996), com adaptações para induzir a fotodegradação forçada por meio de irradiação UV-C, bem como com a Resolução RDC nº 318/2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2019b) e o Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição. O ensaio teve como objetivo avaliar possíveis alterações físico-químicas induzidas pela exposição à luz.

Para isso, DACNys e DACNys:βCD foram acondicionadas em recipientes transparentes e expostas à radiação ultravioleta utilizando uma lâmpada germicida de vapor de mercúrio de baixa pressão (254 nm; UV-C; 10 W; 50 cm de distância), mantendo-se uma distância fixa e controlada entre a fonte luminosa e as amostras. Os cremes adesivos foram expostos de forma contínua por períodos de 24, 48, 72 e 168 h. Paralelamente, amostras controle dos mesmos cremes adesivos, acondicionadas em recipientes opacos e protegidas da luz, foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura durante todo o período experimental (Figura 7). O creme adesivo DAC, foi utilizado como controle negativo.

Figura 7 – Amostras dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD e DAC, acondicionadas em recipientes transparentes, utilizados para exposição à radiação UV-C (254 nm), e em recipientes opacos, destinados à proteção da luz (controle). Ambas as condições foram mantidas sob os mesmos parâmetros experimentais (tempo e temperatura)



Fonte: A autora.

Após cada período de exposição, as amostras passaram pela quantificação de Nys no método UV-Vis e também foram avaliadas conforme suas características

organolépticas, pH e espalhabilidade. Os resultados das amostras expostas à luz foram comparados com os respectivos controles protegidos da luz e com os valores iniciais, a fim de verificar a ocorrência de alterações indicativas de fotoestabilidade dos cremes adesivos (Tønnesen, 2004).

4.2.3.1 Determinação do teor de Nys por espectrofotometria UV-Vis

A quantificação de Nys nos cremes adesivos DACNys e DACNys: β CD foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico, conforme método adaptado de Mustafa et al. (2025). Para a extração do fármaco presente nos cremes adesivos, 0,5 g de cada material foi transferido para um béquer contendo 30 mL de metanol. A mistura foi submetida à agitação magnética por 2 h (Figura 8), seguida de sonicação por 5 min (potência de 80%, pulsador 2, modelo QR350; Eco-Sonics, Brasil), a fim de favorecer a extração do fármaco da matriz semissólida. Em seguida, o volume foi completado com metanol em balão volumétrico de 50 mL. A suspensão obtida foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min. Quando necessário, alíquotas do extrato foram diluídas em solução hidroalcolica a 10% (v/v) utilizada também no preparo da curva de calibração, para adequação à faixa linear do método.

Figura 8 – Extração do fármaco a partir dos cremes adesivos, no qual aproximadamente 0,5 g da amostra foi transferido para um béquer contendo 30 mL de metanol, seguido de agitação magnética e posteriormente de sonicação: a) Formulações protegidas da luz foram envoltas em papel alumínio durante o preparo, a fim de evitar exposição luminosa; b) Grupo de formulações expostas a luz



Fonte: A autora.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata, utilizando como branco o extrato obtido da formulação base sem fármaco (DAC). O teor de Nys

foi calculado a partir da equação da curva de calibração, sendo os resultados expressos como percentual do teor inicial (tempo zero). Para cada formulação, foram empregadas as respectivas curvas analíticas previamente validadas (item 4.2.1), conforme os parâmetros preconizados pelo ICH Q2(R1) (ICH, 2005).

4.2.3.2 Ensaio organoléptico

A avaliação organoléptica dos cremes adesivos foi realizada em cada tempo experimental, com o objetivo de identificar possíveis alterações físicas visuais ao longo do período de armazenamento, conforme preconizado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (Brasil, 2019b). Para essa análise, uma pequena quantidade da amostra foi extraída sobre uma placa de vidro previamente limpa. As avaliações foram conduzidas em ambiente controlado (25 ± 2 °C), sob iluminação artificial branca padronizada e fundo branco. A análise foi realizada por dois avaliadores previamente calibrados quanto à identificação dos cremes adesivos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros, com base nos indicadores de estabilidade física empregados por Mustafa *et al.* (2025): cor, odor, separação de fases, consistência e homogeneidade. Para permitir uma análise semiquantitativa, foi desenvolvida uma escala ordinal numérica para cada parâmetro apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Critérios de avaliação organoléptica dos cremes adesivos

Escore	Cor	Odor	Separação de fases	Consistência	Homogeneidade
0	Branca	Característico ou ausente	Ausente	Muito fluida	Homogênea
1	Levemente amarelada	Levemente alterado	Discreta	Fluida	Levemente heterogênea
2	Amarelada	Desagradável	Moderada	Adequada	Presença de pequenos grumos
3	Escurecida	Rançoso ou intenso	Intensa	Firme	Heterogênea, com separação de fases evidente
4	—	—	—	Muito firme ou de difícil extrusão	—

Fonte: adaptado de Mustafa *et al.* (2025).

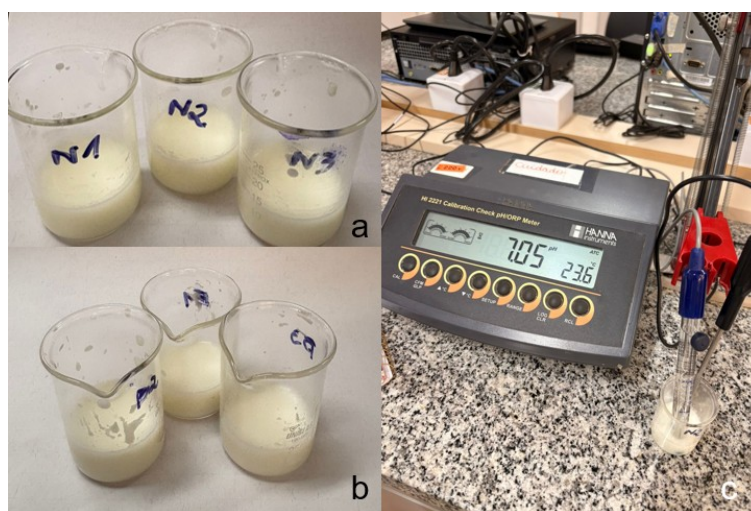
Nos casos em que houve discordância entre os avaliadores, realizou-se uma reavaliação conjunta da amostra até que fosse alcançado um consenso. Adicionalmente, foram obtidos registros fotográficos padronizados das amostras,

realizados a uma distância fixa de 20 cm, com o objetivo de documentar visualmente possíveis alterações ao longo do estudo.

4.2.3.3 Determinação de pH

O pH foi determinado utilizando um pHmetro digital (HI 2221; Hanna Instruments) equipado com eletrodo combinado de vidro para soluções aquosas, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a 25 °C. O creme foi disperso em água destilada na proporção de 1:10 (p/v) sob agitação mecânica por 5 min. Após estabilização da fase, o eletrodo foi imerso no sobrenadante aquoso, e as leituras foram registradas após estabilização do potencial do eletrodo (30–60 s). Foram obtidas três medições consecutivas, sendo utilizado o valor médio. Entre as leituras, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco suavemente (Figura 9; Brasil, 2019a).

Figura 9 – Determinação do pH dos cremes adesivos: a) Aspecto final do extrato do DACNys; b) DACNys:βCD após dispersão água destilada (1:10, p/v); c) Mensuração do pH com eletrodo imerso no sobrenadante aquoso após estabilização do potencial (30–60 s)

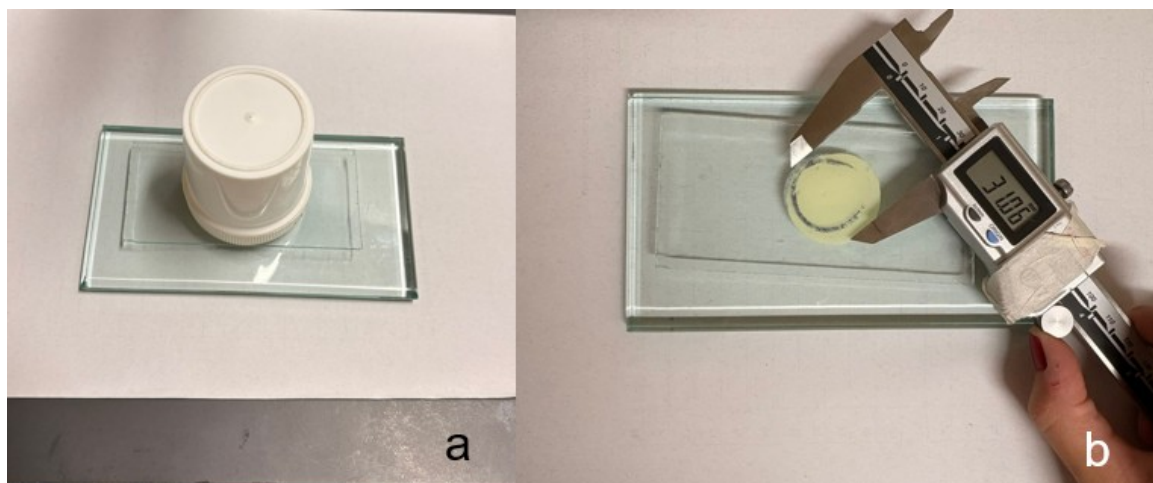


Fonte: A autora.

4.2.3.4 Espalhabilidade

A espalhabilidade foi determinada pelo método das placas paralelas. Aproximadamente 1 g da amostra ($n = 3$) foi colocado no centro de uma placa de Petri de vidro, sobre uma área delimitada (2,5 cm de diâmetro). Outra placa de mesmo foi posicionada sobre a amostra, aplicando-se um peso total de 125 g por 1 min a 25 ± 2 °C (Figura 10). O diâmetro final foi medido em três direções utilizando um paquímetro digital e o valor médio foi obtido (Lardy *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2002).

Figura 10 – Determinação da espalhabilidade pelo método das placas paralelas, com aplicação de 125 g por 1 minuto sobre aproximadamente 1 g da amostra ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)



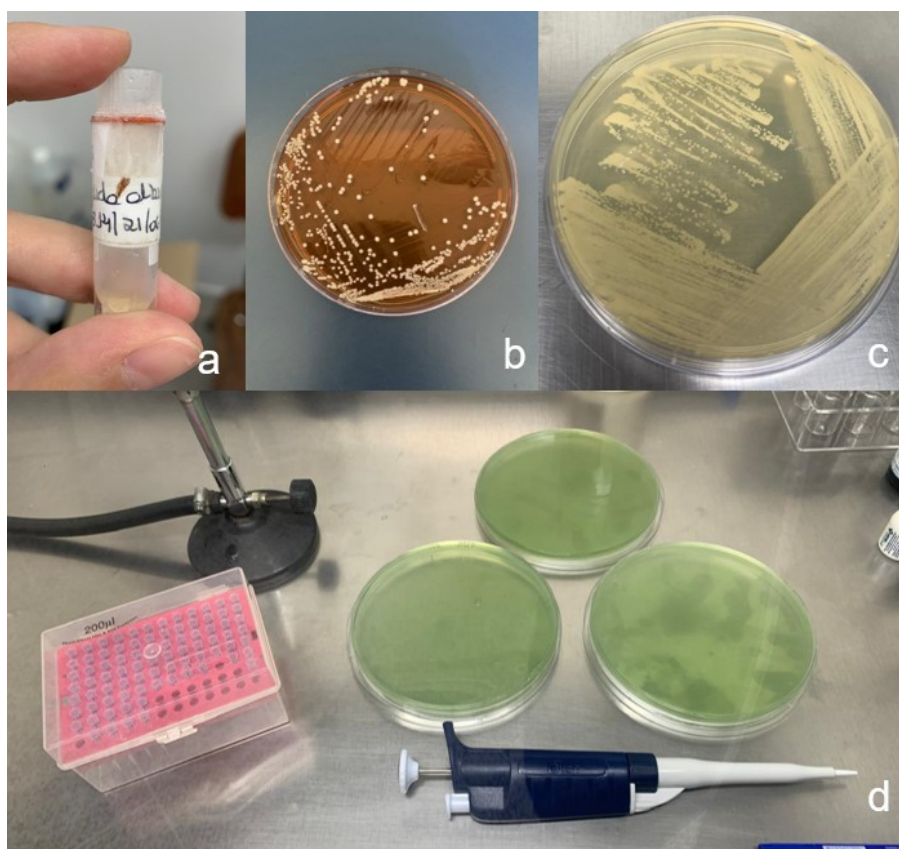
Fonte: A autora.

4.2.4 Difusão em ágar

A atividade antifúngica dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD foi avaliada por meio de ensaio de suscetibilidade frente a *C. albicans* ATCC 90028. Os cremes adesivos DAC e UCC foram utilizadas como controles negativos, enquanto discos antifúngicos contendo fluconazol ($2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram empregados como controle positivo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M44-A2 (2004).

Para a obtenção dos extratos, 1 g de cada creme adesivo foi imerso em 10 mL de meio RPMI-1640, permanecendo incubado a 37°C , sem agitação, por períodos de 3 e 6 h, a fim de promover a liberação do fármaco a partir dos cremes adesivos (Yücesoy; Şentürker GÜltaş; Yulug, 2001). A cepa fúngica foi previamente reativada em ágar YEPD (Sigma-Aldrich) por 24 h. Posteriormente, foi subcultivada em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA; Sigma-Aldrich) e incubada a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 h para garantir crescimento adequado (Figura 11 a-b). O inóculo foi então preparado na concentração aproximada de 1×10^6 UFC/mL, ajustado à turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland.

Figura 11 – Reativação e preparo de *C. albicans* ATCC 90028: a) Crescimento inicial em ágar YEPD por 24 h; b) Subcultivo em ágar Sabouraud Dextrose (SDA) a 35 ± 2 °C por 24 h; c) Placas contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno



Fonte: A autora.

O ensaio foi realizado em triplicata e repetido em três ocasiões independentes. Placas contendo Ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (meio GMB) (Figura 11 c) foram inoculadas com auxílio de swab estéril. Em seguida, discos de papel filtro estéreis (≈ 6 mm de diâmetro) foram impregnados com 10 µL de cada extrato e posicionados sobre a superfície das placas inoculadas. As placas foram incubadas invertidas a 35 °C (± 2 °C) por 24 h. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com paquímetro digital (modelo CD-6" PSX; Mitutoyo, Japão).

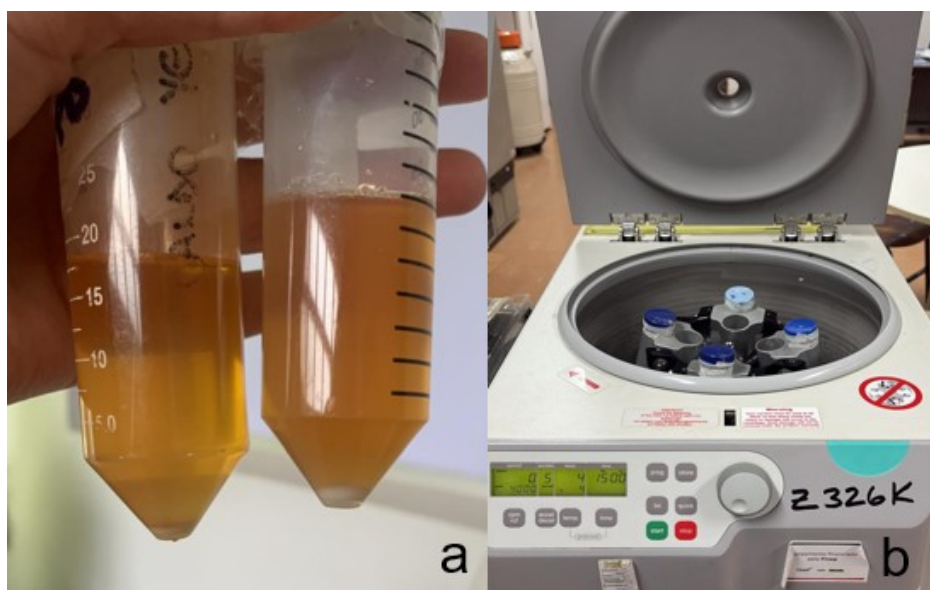
A análise estatística foi realizada no software Jamovi (versão 2.6.13.0). Foram avaliadas a normalidade e a homogeneidade das variâncias, seguidas de análise de variância (ANOVA) e teste post hoc de Tukey, quando aplicável. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.2.5 Atividade metabólica sobre biofilme de *C. albicans*

Para avaliar o efeito antifúngico de DACNys e DACNys: β CD sobre biofilme de *C. albicans*, foi realizado o ensaio de quantificação de biofilme, pela técnica de redução de sais de tetrazólio- XTT e a contagem das unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) das células planctônicas dos poços contendo biofilmes.

Para isso, uma cepa de *C. albicans* (SC314) cedida pela Faculdade de Odontologia de Araraquara/Universidade Estadual Paulista, FOAr/UNESP, foi reativada em meio de cultura YEPD Ágar (Clontech Laboratories Inc.) e incubada a 37 °C por 48 h em estufa bacteriológica. Uma colônia média foi selecionada e inoculada em 20 mL de caldo YEPD, mantido em estufa a 37 °C por 16 h. O pré-inóculo resultante foi centrifugado (Z 326 K; Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) a 4.000 rpm e 4 °C por 15 min (Figura 12 b); o sobrenadante do pellet foi descartado, e 5 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) foram adicionados. O conteúdo restante foi homogeneizado em um vórtex e centrifugado nas mesmas condições, repetindo-se esse processo por duas vezes. Por último, 20 mL de PBS estéril foram adicionados ao pellet e homogeneizados em um vórtex (Bueno *et al.*, 2015; Moraes *et al.*, 2021).

Figura 12 – a) Pré-inóculo obtido após 16 h de crescimento em estufa bacteriológica a 37°C; b) Pré-inóculo sendo centrifugado a 4.000 rpm, a 4°C por 15 min



Fonte: A autora.

Para confirmar a concentração do inóculo, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) e 10 μ L dessas suspensões foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco®) mantidas em incubadora a 37 °C por 48 h (Figura 13 a).

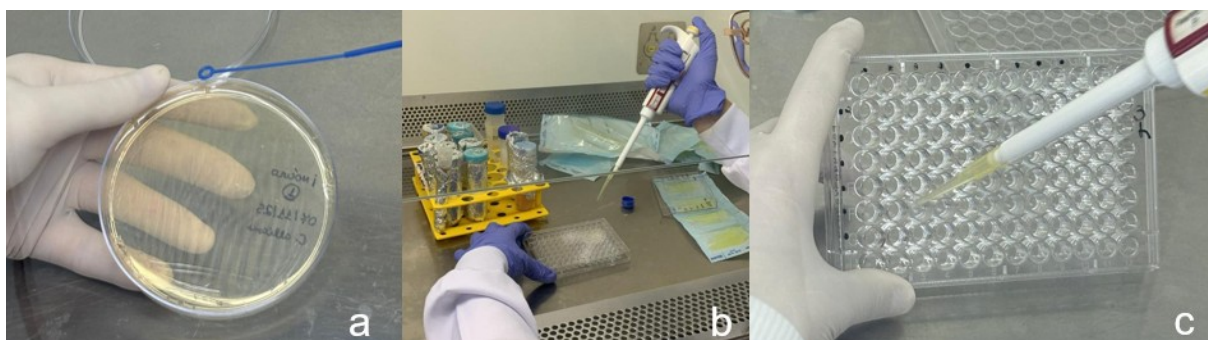
A contagem das colônias de *C. albicans* foi transformada em UFC/mL a partir da equação abaixo:

$$UFC/ml = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q} \quad (3)$$

*n equivale ao valor absoluto da diluição, e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição durante a semeadura das placas.

Para a adesão celular e a formação inicial do biofilme, 100 μ L do inóculo (2×10^7 UFC/mL), foram adicionados aos poços de placas de cultura de 96 poços, as quais foram incubadas a 37 °C por 90 min sob agitação orbital (Figura 13 b c) (80 rpm; modelo 430/RDBP, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

Figura 13 – a) Alíquota de 10 μ L da suspensão do inóculo diluída a 10^{-3} semeada em ASD, incubadas a 37 °C por 48 h; b e c) 100 μ L de inóculo inoculado em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços



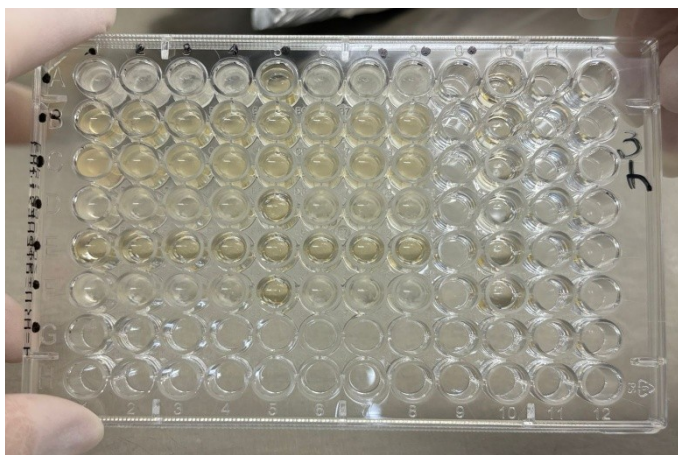
Fonte: A autora.

Posteriormente, os poços foram pipetados para remover o inóculo e lavados com PBS estéril (100 μ L). Em seguida, 100 μ L de meio de cultura RPMI-1640 contendo 2% de glicose e MOPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados, mantendo-se em estufa (37 °C, 24 h) para promover a formação de biofilme maduro (Urban *et al.*, 2023). Após esse período, o sobrenadante de cada poço foi removido, e o poço lavado duas vezes com 100 μ L de PBS (Bueno *et al.*, 2015). Para o controle da viabilidade do microrganismo (controle positivo), foi utilizado o inóculo de *C. albicans* puro e para o controle de esterilidade, 100 μ L de meio de cultura RPMI.

Para a realização do tratamento dos biofilmes, foi necessário obter os extratos

dos cremes adesivos. Para isso, 1 g de cada formulação (DACNys, DACNys:βCD, DAC e UCC) foi imerso em 3 mL do meio RPMI 1640 e incubado a 37 °C por 3 e 6 h, com o objetivo de permitir a liberação espontânea dos componentes ativos. Após a formação do biofilme no fundo dos poços das placas de 96 poços, cada poço recebeu 100 µL de RPMI 1640 e 100 µL do extrato correspondente a cada grupo experimental, de acordo com os tempos de liberação (3 h ou 6 h) (Figura 14). As placas foram então incubadas por mais 24 h a 37 °C sob agitação orbital a 80 rpm.

Figura 14 – Poços tratados com seus respectivos extratos de tratamentos

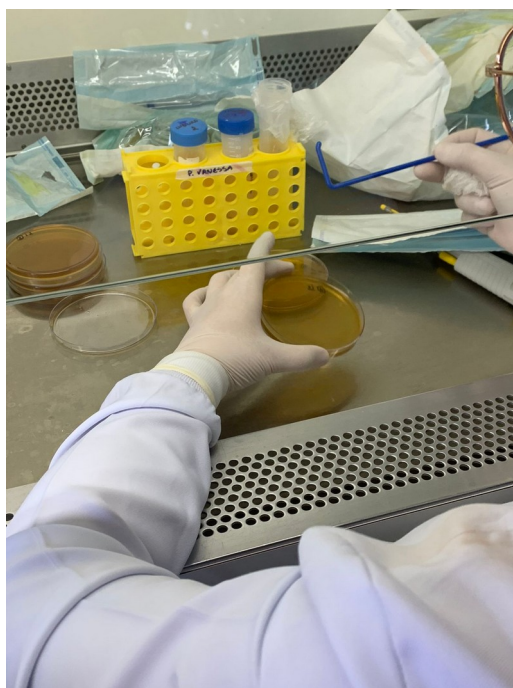


Fonte: A autora.

4.2.5.1 Contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL)

Após a incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) das células planctônicas. O conteúdo de cada poço foi submetido a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) e alíquota de 10 µL foi semeada em triplicata em placas contendo ASD (Figura 15), as quais foram incubadas em estufa bacteriológica (37 °C por 24 h). Após a incubação, procedeu-se à contagem das colônias de *C. albicans* para determinação dos valores de UFC/mL, de acordo com os grupos experimentais e os tempos de tratamento (3 h e 6 h). Para apresentação dos resultados, os valores de UFC/mL foram posteriormente convertidos em $\log_{10}(\text{UFC/mL})$.

Figura 15 – Células planctônicas após diluição, sendo semeados em triplicata em placas de ASD



Fonte: A autora.

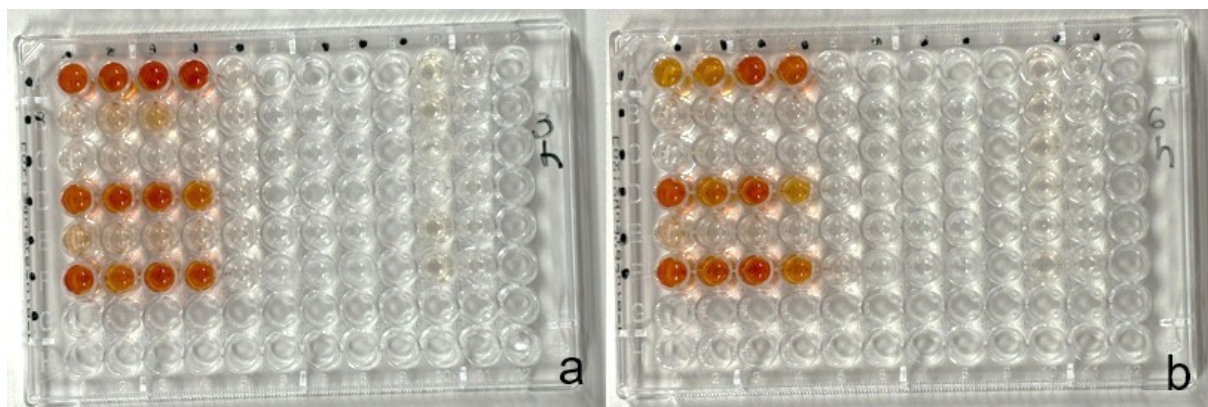
4.2.5.2 Ensaio de viabilidade metabólica (XTT)

Para a quantificação do biofilme fúngico, foi utilizado o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio-XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide; Sigma-Aldrich). Neste método, os sais de tetrazólio penetram nas células viáveis de *C. albicans* e, por meio da atividade metabólica, promovem a conversão da coloração do reagente. Após as 24 h de tratamento, cada poço foi lavado com PBS, seguidos pela adição de 200 μ L da solução de XTT. As placas foram incubadas em incubadora orbital (3 h; 80 rpm; 37°C) para a reação (Figura 16 a-b). O conteúdo de cada poço foi submetido à leitura em espectrofotômetro (ELx800; Biotek, Winooski, VT, EUA) a 520 nm, o valor dos sais de tetrazólio-XTT puro foi descontado de todos os poços. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagens de redução do crescimento fúngico comparados ao controle positivo, ou seja, sem tratamento (Urban *et al.*, 2023).

(4)

* % redução (porcentagem de redução da atividade fúngica); abs control (média do grupo controle); abs experimental (média da absorbância dos poços tratados) (CLSI, 2004).

Figura 16 – Ação dos sais de tetrazólio XTT: a) Após 3 h; b) Após 6 h



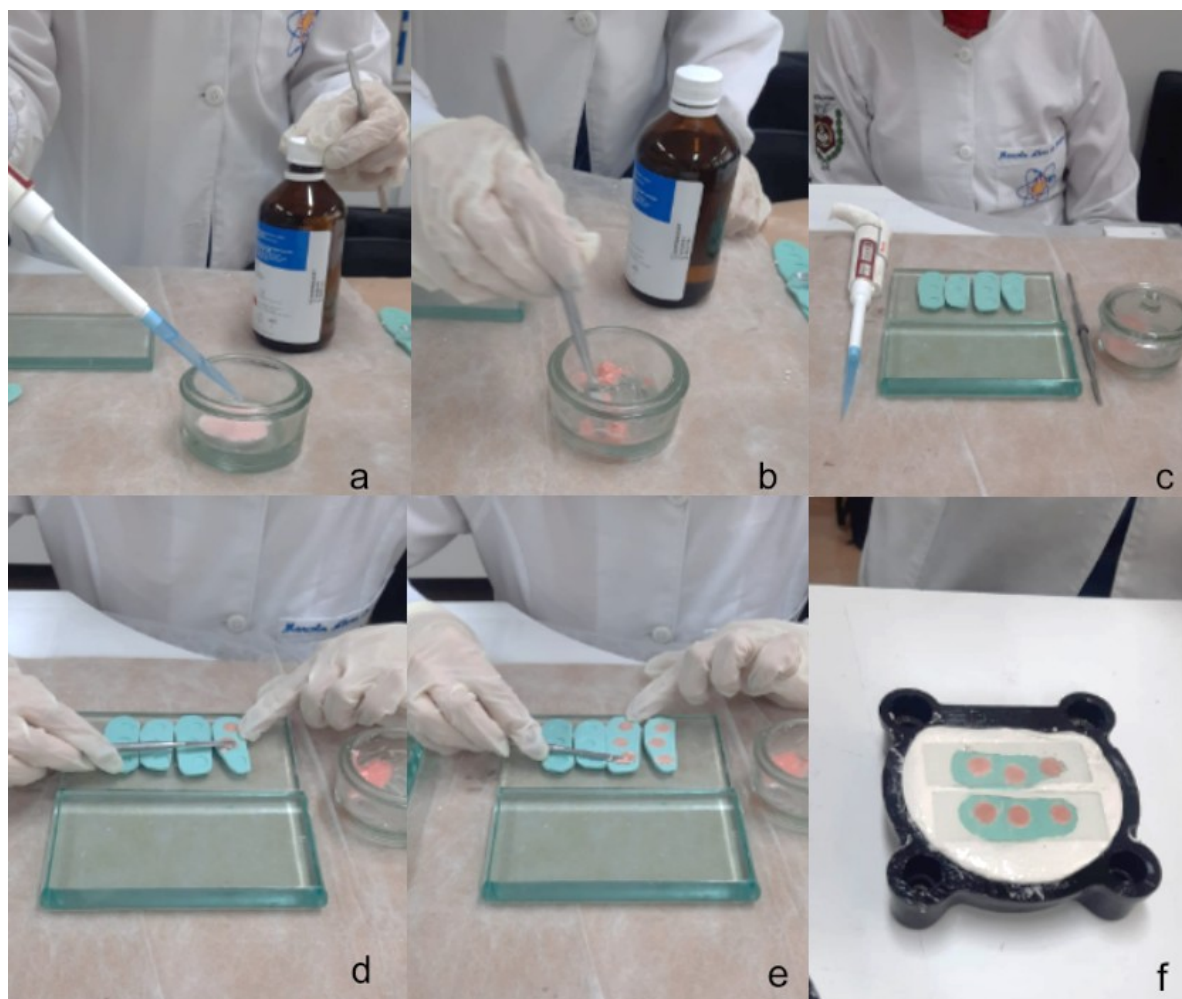
Fonte: A autora.

4.2.6 Atividade metabólica de biofilme de *C. albicans* em espécimes de resina acrílica

4.2.6.1 Confecção dos espécimes

Os corpos de prova foram confeccionados em formato circular (10×1 mm; $N = 120$), utilizando resina acrílica termopolimerizável para base de prótese dentária tipo 1 (VipiCril Plus; VIPI Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., Pirassununga, SP, Brasil) e polimerizados em forno de micro-ondas. A proporção utilizada foi de 2,15 mg de polímero para 0,01 mL de monômero (Figura 17 a,b). A inclusão da resina na fase plástica foi realizada em moldes de silicone laboratorial (Perfil Lab; Perfil Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil), posicionados em muflas plásticas preenchidas com gesso tipo IV, compatíveis com o uso em forno de micro-ondas (Figura 17 c-f). Em seguida, as muflas foram prensadas sob carga de 1200 Kgf por 30 min, utilizando-se uma prensa hidráulica, sendo posteriormente submetidas à polimerização térmica em forno de micro-ondas a 550 W por 3 min (Ilbay; Güvener; Alkumru, 1994). Após a polimerização, as muflas foram resfriadas em água por 30 min.

Figura 17 – a) Adição do monômero ao polímero; b) Homogeneização da mistura com espátula; c) Espera até que a resina atinja a fase plástica; d–e) Inserção da resina nos moldes de silicone; f) Mufla preenchida com os moldes



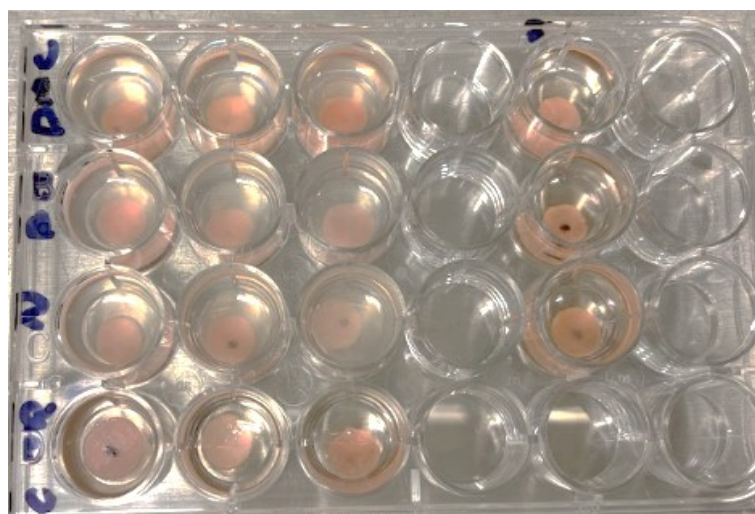
Fonte: A autora.

Com os corpos de prova finalizados, os excessos foram removidos, e suas superfícies foram polidas com lixas de carbeto de silício de granulação 120 por 20 s, de modo que uma das faces apresentasse rugosidade superficial média de aproximadamente $3,0\ \mu\text{m}$ (Costa *et al.*, 2022). A rugosidade foi mensurada com auxílio de um rugosímetro (Surftest SJ-301; Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japão), simulando a superfície interna da base de próteses removíveis (Silva *et al.*, 2016). Após o término do polimento, os espécimes foram imersos em água destilada a $37\ ^\circ\text{C}$ por 48 h para promover a liberação do monômero residual, conforme recomendação da norma ISO 1567 (ISO, 1998). Posteriormente, foram submetidos à esterilização por exposição à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar (Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda., Campinas, Brasil) por 20 min de cada lado.

4.2.6.2 Formação do biofilme de *C. albicans* sobre o espécime de resina acrílica

O inóculo foi preparado conforme descrito no tópico 4.2.5. Cada espécime foi individualmente posicionado em poços de placas de 24 poços, com a superfície de interesse voltada para cima. Em seguida, foram adicionados 2 mL do inóculo de *C. albicans* sobre cada espécime (Figura 18), sendo as placas submetidas à incubação em agitador orbital por 90 min, a 75 rpm e 37 °C, para permitir a adesão inicial das células.

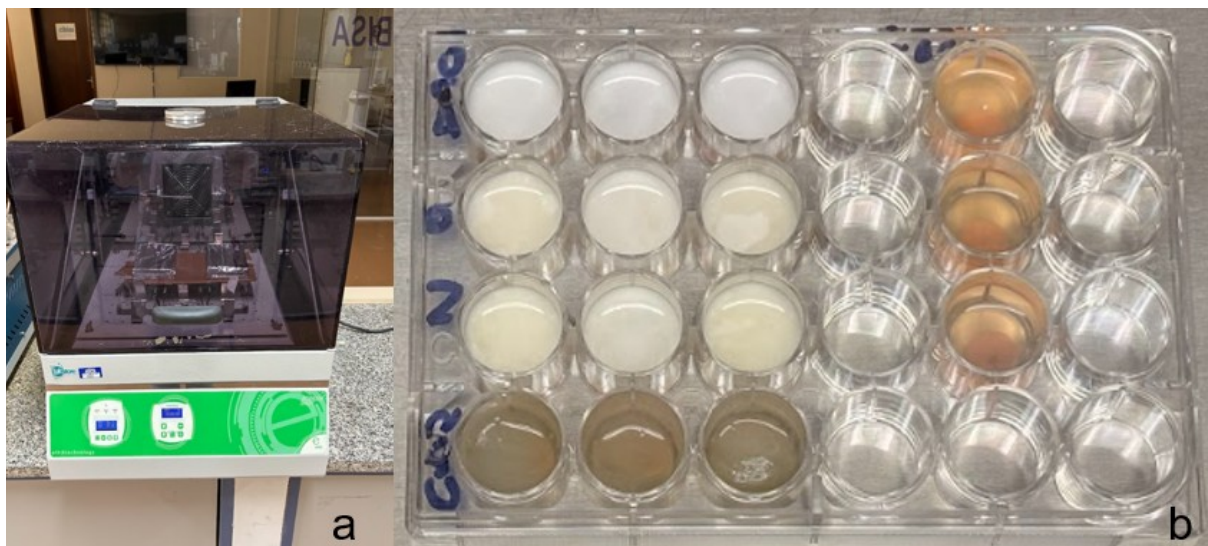
Figura 18 – Posicionamento dos espécimes em placa de 24 poços e adição do inóculo de *C. albicans* (2 mL) sobre a superfície de interesse



Fonte: A autora.

Após esse período, os espécimes foram cuidadosamente lavados com PBS para remover as células não aderidas e imersos em meio RPMI suplementado com 2% de glicose. Em seguida, foram incubados sob proteção da luz, em agitador orbital (75 rpm), a 37 °C, por 24 h (Figura 19a). Após esse intervalo, o meio foi substituído por meio fresco, seguido de nova incubação por 24 h nas mesmas condições, totalizando 48 h de maturação do biofilme. Posteriormente, foi aplicada sobre cada espécime seu respectivo tratamento. Uma solução contendo 30 mg de cada mucoadesivo, previamente diluída em 1 mL de PBS, permanecendo em contato por 6 h (Figura 19 b).

Figura 19 – a) Espécimes imersos em meio RPMI suplementado com 2% de glicose, protegidos da luz e incubados em agitador orbital por 24 h, a 75 rpm e 37 °C, seguidos da substituição do meio e nova incubação por mais 24 h nas mesmas condições; b) Aplicação dos respectivos tratamentos, consistindo em solução contendo 30 mg de cada adesivo, previamente diluída em 1 mL de PBS, mantida em contato com os espécimes por 6 h, sob proteção da luz e agitação orbital

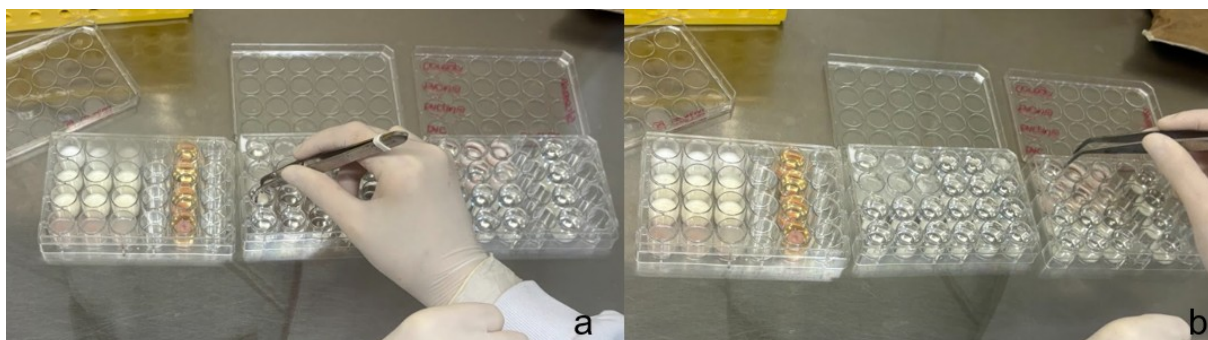


Fonte: A autora.

4.2.6.3 Ensaio de redução do XTT

Espécimes contaminados e tratados ($n = 5$ por grupo) foram lavados em 2 mL de PBS e posteriormente transferidos para poços individuais de placas de 24 poços, aos quais foram adicionados 2 mL de solução de XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio hidróxido; Sigma-Aldrich® Inc; Figura 20). As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37 °C por 3 h.

Figura 20 – a) Espécimes contaminados e tratados foram lavados com 2 mL de PBS; b) Transferidos para poços individuais de placas de 24 poços e incubados com 2 mL de solução de XTT

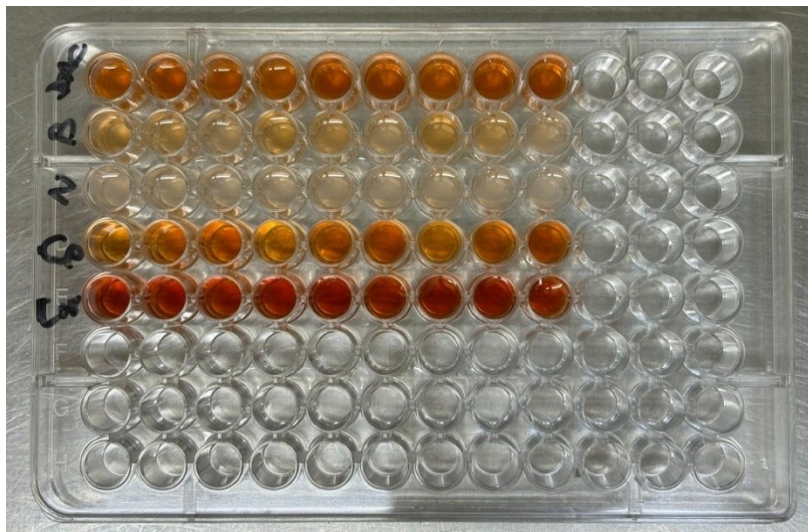


Fonte: A autora.

Em seguida, 1,6 mL do conteúdo de cada poço foi coletado em eppendorfs e centrifugado a 10.000 rpm por 2 min a 10 °C, a fim de decantar resíduos de adesivo (Chandra *et al.*, 2001a). Um volume de 200 μ L do desse conteúdo foi transferido, em

triplicata, para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi determinada a 520 nm em espectrofotômetro (Figura 21). Três experimentos independentes foram realizados ($n = 9$) (Almeida *et al.*, 2018).

Figura 21 – A partir de 1,6 mL do conteúdo de cada poço, transferida para microtubos e centrifugada a 10.000 rpm por 2 min, a 10 °C, alíquota de 200 µL foram pipetados em triplicata, em placa de 96 poços



Fonte: A autora.

Os valores finais representaram a atividade metabólica do biofilme viável. Quanto maior a absorbância, maior a atividade metabólica. Os dados foram convertidos em porcentagens de redução de crescimento fúngico (Almeida *et al.*, 2018) seguindo o mesmo cálculo do item 4.2.5.2.

4.2.6.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após os respectivos tratamentos, os espécimes ($n = 3$) foram fixados em glutaraldeído diluído em PBS 0,1 M, na concentração final de 2,5%, por 150 min. Em seguida, foram lavados três vezes em PBS e desidratados por 10 min em série crescente de etanol (35%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 100% e 100%). Posteriormente, os espécimes foram submetidos à secagem com hexametildisilazano (HMDS), inicialmente a 50% por 10 min e, em seguida, a 100% por mais 10 min. Após essa etapa, foram mantidos em capela por 48 h a 22 °C. Por fim, os espécimes foram montados em suportes metálicos, metalizados com ouro (IC-50; Shimadzu) e analisados em microscópio eletrônico de varredura (SSX-550 Superscan; Shimadzu), operando a 10 kV, com tempo de varredura de 100 s (Moraes *et al.*, 2021).

4.2.7 Citotoxicidade (MTT)

A avaliação da citotoxicidade foi conduzida de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO, 2009). Células de fibroblastos murinos da linhagem 3T3 (Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0017) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $2,5 \times 10^3$ células/cm², em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Vitrocell) e antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina; Gibco), sendo incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS (Coelho *et al.*, 2019).

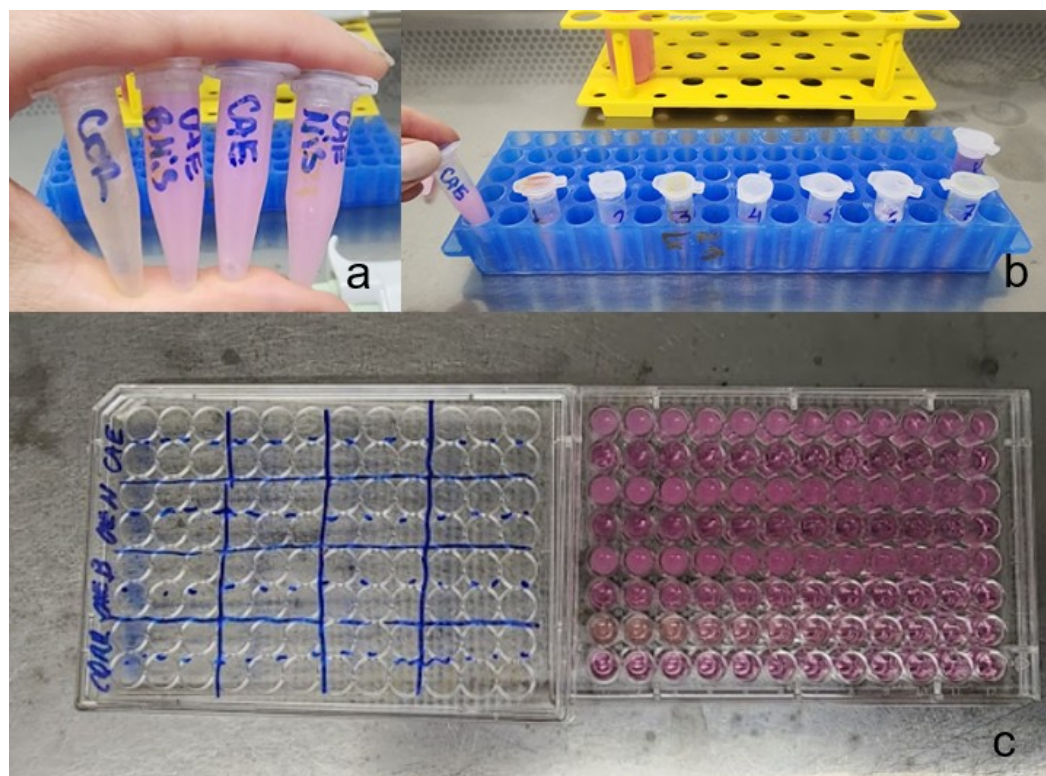
Para o preparo das soluções de tratamento, cada material foi inicialmente pesado em balança de precisão (20 mg). Considerando que DACNys e DACNys:βCD apresentam concentração de ~17,5 mg de Nys por g de material, a massa de 20 mg corresponde a 0,35 mg (350 µg) de Nys. Essa quantidade foi diluída em 1600 µL de meio RPMI-1640, resultando em uma concentração inicial de 218,7 µg/mL (equivalente a 1:80 em relação ao material) (Figura 22 a). A partir dessa solução estoque, foram realizadas diluições seriadas na proporção 1:2, obtendo-se as seguintes concentrações finais: 109,4 µg/mL (1:160), 54,7 µg/mL (1:320), 27,3 µg/mL (1:640), 13,8 µg/mL (1:1280), 6,8 µg/mL (1:2560), 3,4 µg/mL (1:5120), 1,7 µg/mL (1:10240), 0,85 µg/mL (1:20480) (Figura 22 b).

Como controle positivo antifúngico, foi utilizada a NysOS (100.000 UI/mL), empregada como referência de atividade antifúngica conhecida frente a *C. albicans*. Adicionalmente, o creme adesivo comercial UCC foi incluído como controle comparador, com o objetivo de estabelecer um parâmetro de desempenho em relação a um produto amplamente utilizado na prática clínica. Os resultados obtidos para os materiais experimentais (DAC, DACNys e DACNys:βCD) foram, portanto, comparados tanto a um controle positivo farmacológico quanto a um controle comercial, permitindo a avaliação da eficácia relativa e do desempenho biológico dos sistemas desenvolvidos. Como controle negativo de citotoxicidade foi constituído por células cultivadas apenas em meio RPMI-1640, sem exposição a qualquer material ou fármaco, representando a condição de viabilidade celular máxima (100%).

Alíquotas de 200 µL de cada diluição foram adicionadas aos poços contendo as células previamente cultivadas, e as placas permaneceram incubadas por 72 h nas mesmas condições experimentais (Figura 22 c). Após o período de incubação, a

viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), conforme descrito por Mosmann (1983). O meio foi removido, os poços lavados com PBS e adicionada solução de MTT (0,5 mg/mL) preparada em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C. O reagente excedente foi descartado e os cristais de formazan formados foram solubilizados com álcool isopropílico acidificado com HCl (0,1 M). A absorbância foi medida a 520 nm em leitor de microplacas (ELx800; Biotek, Winooski, VT, EUA). A intensidade da coloração púrpura obtida foi proporcional à atividade metabólica celular, refletindo a viabilidade das células.

Figura 22 – a) Preparo da solução inicial dos materiais após diluição de 20 mg em 1600 µL de meio RPMI-1640; b) Preparo das diluições seriadas a partir da solução estoque, obtendo-se diferentes concentrações de tratamento; c) Distribuição dos tratamentos em placa de 96 poços com tratamentos em diferentes diluições



Fonte: A autora.

A porcentagem de viabilidade celular (%) foi calculada de acordo com a Equação a seguir:

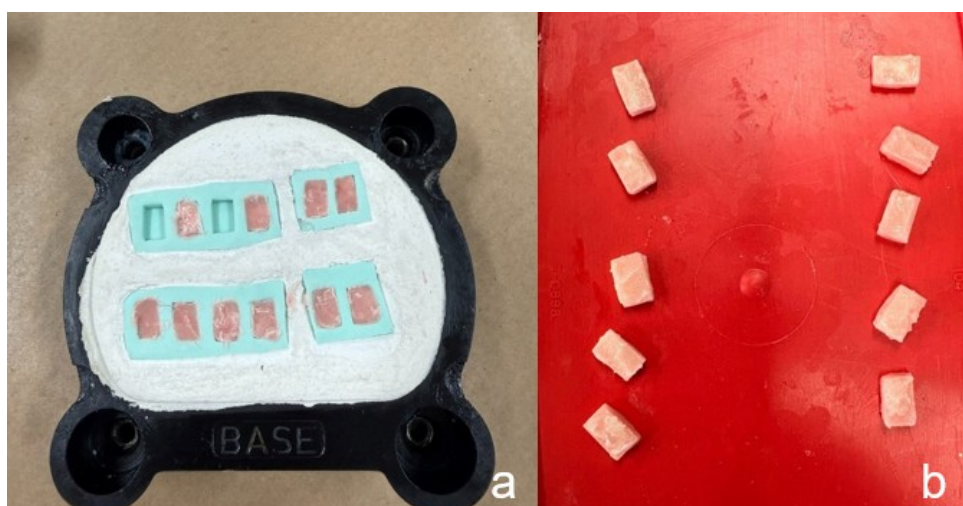
*onde “Abs experimental” corresponde à média das absorbâncias dos grupos tratados e “Abs controle” refere-se à média do grupo controle negativo.

A citotoxicidade foi determinada com base na redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo. De acordo com a ISO 10993-5 (ISO, 2009), amostras que apresentaram viabilidade celular $\geq 70\%$ foram classificadas como não citotóxicas. O ensaio foi realizado em quadruplicata e repetido em quatro ocasiões independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0 para Windows; GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas.

4.2.8 Facilidade de remoção de adesivos em espécimes de resina acrílica

Para o ensaio de remoção de adesivos protéticos, foram confeccionados corpos de prova retangulares ($6 \times 10 \times 3$ mm; $N = 200$; Figura 23 a). Os espécimes foram submetidos a polimento, liberação de monômero residual e avaliação da rugosidade superficial (R_a), utilizando rugosímetro com parâmetro de $3 \mu\text{m}$, conforme descrito no tópico 4.2.6.1.

Figura 23 – a) Mufla plástica preenchida com gesso e os moldes em silicone laboratorial com formato retangular, nos quais foi inserida resina acrílica termopolimerizável para a confecção dos corpos de prova; b) Espécimes com 0,025g de adesivo aplicados sobre cada um deles

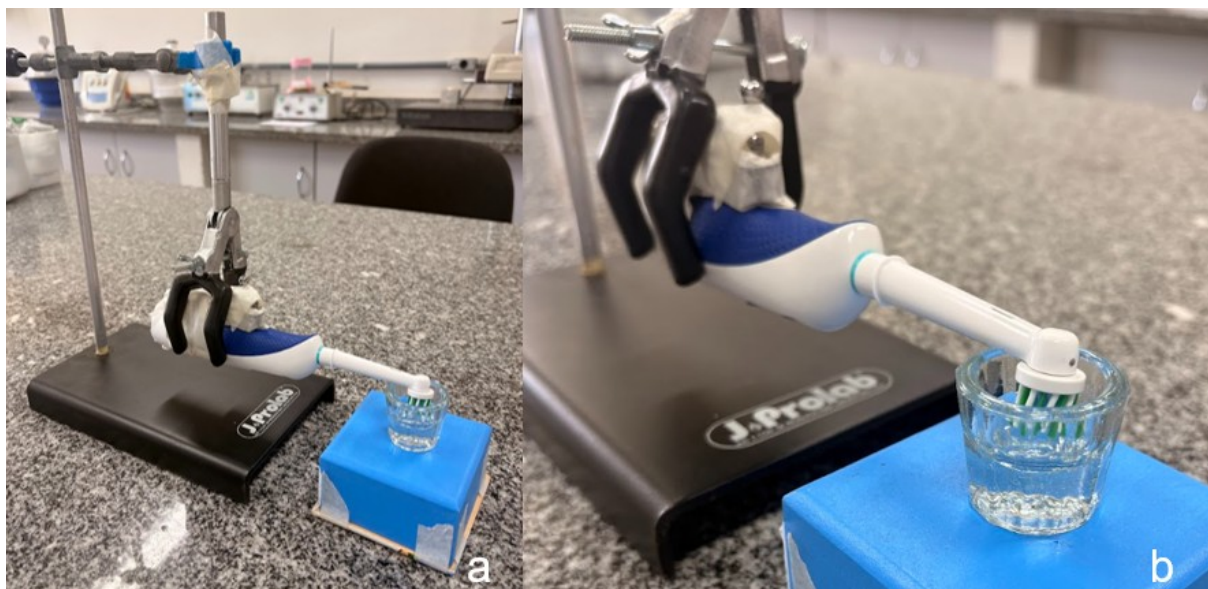


Fonte: A autora.

Posteriormente, os corpos de prova foram recobertos com 0,025 g dos materiais DACNys, DACNys: β CD, DAC ou UCC (Figura 23 b). A escovação foi realizada com escova elétrica (Oral-B® Pro Health Power, Procter & Gamble,

Cincinnati, OH, EUA) acoplada a um suporte fixo, com peso padronizado de 190 g (Figura 24 a b).

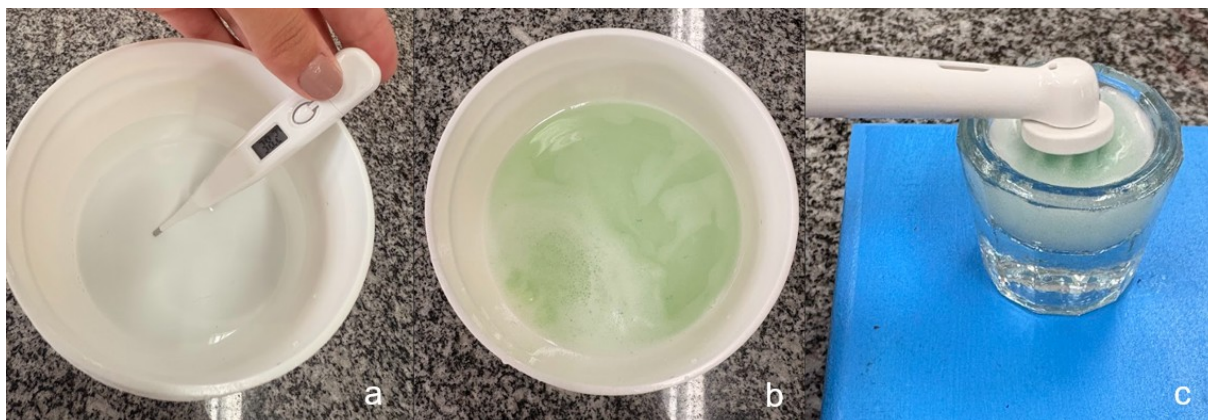
Figura 24 – a) Sistema de escovação padronizado, no qual a escova elétrica foi acoplada a um suporte fixo, com aplicação de carga constante de 190 g durante o procedimento; b) Recipiente tipo Dappen utilizado para acondicionamento do espécime juntamente com a respectiva solução



Fonte: A autora.

Os corpos de prova foram submetidos aos protocolos de higienização descritos por Costa et al. (2022) com algumas modificações, distribuídos em cinco grupos ($n = 10$): (1) escovação com água morna destilada ($38\text{ }^{\circ}\text{C}$); (2) escovação com sabonete líquido (Protex® Limpeza Profunda, Colgate-Palmolive Company, São Paulo, SP, Brasil); (3) escovação com creme dental (Colgate® Máxima Proteção Anticáries, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brasil); (4) imersão em Corega Tabs® (GlaxoSmithKline, Weybridge, UK) por 5 min; e (5) imersão em Corega Tabs® por 5 min seguida de escovação com a própria solução. Em todos os grupos de escovação, o procedimento foi realizado por 1 min. Para os grupos de imersão, os espécimes foram mantidos por 5 min em 250 mL de água morna ($38\text{ }^{\circ}\text{C}$). No grupo de imersão associada à escovação, após o período de imersão, realizou-se escovação por 1 minuto com a própria solução (Figura 25 a-c).

Figura 25 – a) 250 mL de água destilada aquecida a 38 °C, com temperatura verificada por termômetro digital; b) Espécime imerso em solução de água destilada morna contendo pastilha Corega Tabs®; c) Procedimento de escovação com a própria solução de Corega Tabs® por 1 minuto



Fonte: A autora.

Após os procedimentos de higienização, os espécimes foram lavados com água destilada e imersos em solução de corante a 1% (Vermelho Neutro; Gold Lab) por 5 min. Em seguida, foram fotografados com câmera posicionada em suporte fixo, mantendo o eixo óptico perpendicular (90°) à superfície dos espécimes e distância focal padronizada (Figura 26).

Figura 26 – Câmera posicionada em suporte fixo, mantendo o eixo óptico perpendicular (90°) à superfície dos espécimes e distância focal padronizada



Fonte: A autora.

A quantificação do adesivo remanescente foi realizada a partir das imagens obtidas. Dois examinadores, previamente treinados e cegos quanto aos grupos

experimentais, mensuraram, por meio do software ImageJ, a área total do espécime e a área corada pelo corante. A confiabilidade interexaminadores foi avaliada pelo coeficiente de correlação intraclasse (ICC) utilizando o software SPSS versão 22.0. A partir dessas medidas, foi calculada a porcentagem (%) da área superficial coberta pelo adesivo remanescente (Costa *et al.*, 2022).

4.2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados no software SPSS versão 22.0. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, enquanto a homogeneidade foi testada com Levene. Para dados paramétricos, utilizou-se ANOVA com pós-teste de Tukey; para dados não paramétricos, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$)

5 RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (UV-VIS) PARA QUANTIFICAÇÃO DE NISTATINA LIVRE

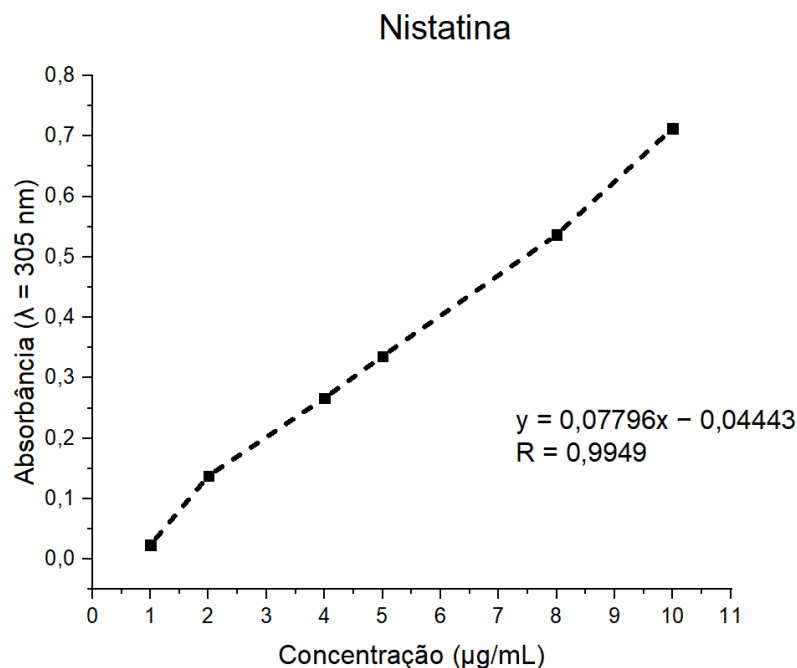
O método espectrofotométrico desenvolvido apresentou parâmetros apropriados para a quantificação da Nys nas condições avaliadas. Os resultados obtidos atendem aos critérios de validação estabelecidos pelas diretrizes da Anvisa (Brasil, 2017b).

5.1.1 Linearidade

A curva analítica de calibração da Nys (Figura 27) apresentou comportamento linear no intervalo de 1 a 10 µg/mL, com coeficiente de correlação ($R = 0,9949$), indicando forte correlação entre concentração e absorbância. A equação da reta obtida foi $y = 0,07796x - 0,04443$, evidenciando adequada sensibilidade do método.

Para avaliar a uniformidade das variâncias entre os diferentes níveis de concentração, a homocedasticidade foi determinada por meio do teste de Cochran. Os resultados indicaram comportamento heterocedástico, evidenciando variância não constante ao longo da faixa analisada. Assim, a aplicação do método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) mostrou-se mais adequada para o ajuste dos dados experimentais.

Figura 27 – Curva de calibração da Nys obtida por UV-Vis a 305 nm, relacionando a absorbância com a concentração (1–10 µg/mL), após ajustes adequados pelo MMQP



Fonte: A autora.

A análise dos resíduos foi realizada com o objetivo de avaliar a adequação do modelo linear. Os resíduos apresentaram distribuição centrada próxima de zero e ausência de tendência sistemática no gráfico de dispersão, indicando bom ajuste do modelo aos dados experimentais. O teste de normalidade de Shapiro–Wilk indicou que os resíduos não seguem distribuição normal ($W = 0,819$; $p < 0,05$). No entanto, a ausência de padrões sistemáticos na dispersão dos resíduos sugere que não há erros estruturais no modelo, sendo este considerado adequado para fins analíticos na faixa de concentração estudada.

Outro requisito relacionado à linearidade consiste em demonstrar a significância do coeficiente angular da curva analítica, o que pode ser avaliado por meio do teste F da ANOVA, apresentada na Tabela 4. A análise de regressão demonstrou que o coeficiente angular foi significativamente diferente de zero ($p < 0,001$), evidenciando a existência de relação linear entre a concentração e a resposta analítica, em conformidade com a RDC nº 166/2017 (Art. 27, § 4º). A significância do modelo também foi confirmada pela análise de variância (ANOVA), que indicou regressão estatisticamente significativa ($F = 774,53$; $p < 0,001$). Além disso, o valor de F calculado foram substancialmente superiores ao valor de F tabelado (3,63), demonstrando que a maior parte da variabilidade da resposta é explicada pela regressão linear. Esses resultados confirmam que a resposta analítica varia proporcionalmente em função da concentração, evidenciando a adequação do modelo linear para a faixa estudada.

Tabela 4 – Resultado do teste F da Anova para determinação da significância do coeficiente angular para a nistatina

Parâmetro	Valor	F calculado	F tabelado (95%)	p-valor
Regressão	0,8436	774,53	3,63	$p < 0,001$
Resíduo	0,0087			
Total	0,8523			

Fonte: A autora.

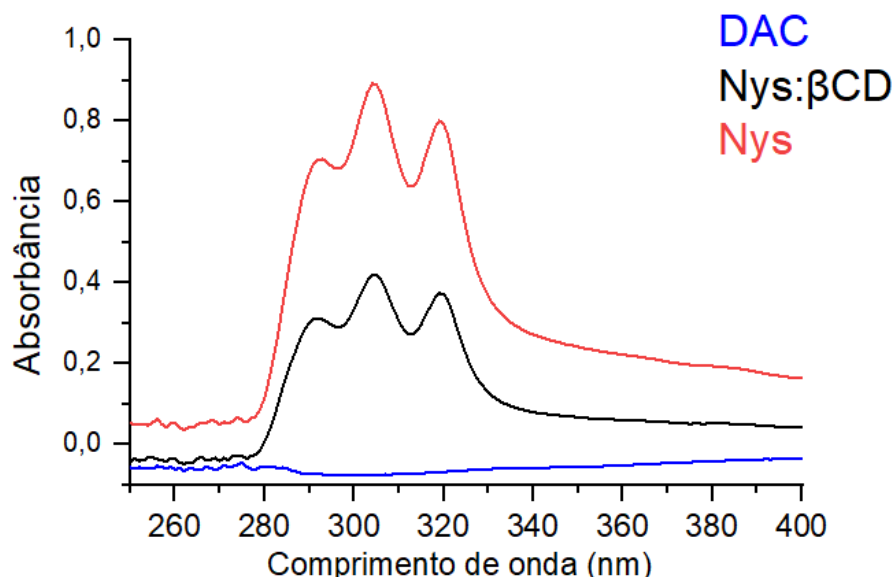
De modo geral, os resultados obtidos, aliados às análises estatísticas aplicadas, confirmam a linearidade do método, evidenciando sua capacidade de gerar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de Nys nas amostras, conforme descrito pela equação da reta.

5.1.2 Seletividade

A seletividade obtida (Figura 28) confirmou a viabilidade do método UV-Vis frente à complexidade da matriz adesiva. A seletividade foi avaliada por meio da análise das amostras de Nys, Nys:βCD e do excipiente DAC, utilizando absorbância em 305 nm, com posterior comparação dos valores obtidos, a fim de verificar possíveis interferências dos componentes da formulação no comprimento de onda de análise. Observou-se que DAC apresentou absorbância negativa em 305 nm, o que demonstra que os excipientes da formulação não interferem na detecção do analito. Dessa forma, o método demonstrou ser seletivo para a quantificação da Nys. Além disso, ocorreu

uma redução na absorbância da Nys:βCD (de 0,418 para 0,271), o que é sugestiva do processo de complexação.

Figura 28 – Espectros de absorção na região do ultravioleta (240–400 nm) da nistatina livre (Nys), do complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina (Nys:βCD) e do creme adesivo para prótese sem fármaco (DAC)



DAC: Creme adesivo experimental; Nys:βCD: complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina; Nys: nistatina. Fonte: A autora.

5.1.3 Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico refere-se à proximidade entre resultados obtidos sob condições específicas, considerando a dispersão das medições, incluindo repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). Neste estudo, a precisão do método foi avaliada nas concentrações de 3, 6 e 9 µg/mL, apresentando baixos valores de desvio padrão e coeficiente de variação ($DPR\% < 5\%$), o que indica boa repetibilidade. Além disso, o teste t de Student indicou ausência de diferença estatisticamente significativa entre as concentrações preditas e as concentrações determinadas experimentalmente ($p > 0,05$), tanto nas análises intradia quanto interdia, evidenciando a consistência dos resultados obtidos.

A exatidão, que corresponde ao grau de concordância entre os valores experimentais obtidos e um valor aceito como verdadeiro, foi confirmada por meio de testes de recuperação realizados nos mesmos níveis de concentração (3, 6 e 9 µg/mL) em diferentes períodos analíticos. As médias de recuperação obtidas variaram entre 95,8% e 102,0%, demonstrando que o método é capaz de quantificar a Nys. Dessa

forma, o método demonstrou adequada precisão e exatidão, atendendo aos critérios de validação estabelecidos.

5.1.4 Limite de detecção e de quantificação

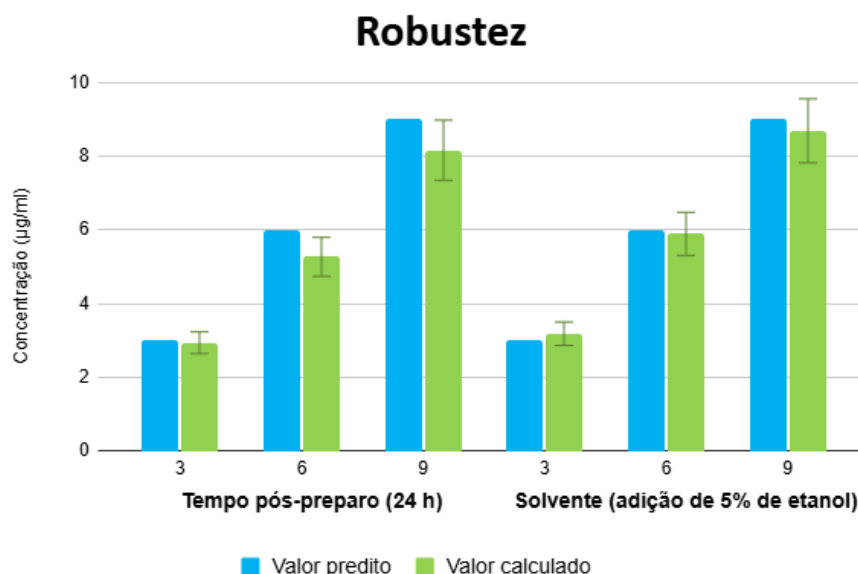
O LD foi definido como a menor quantidade do analito presente na amostra capaz de ser detectada, ainda que não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas, conforme preconizado pela RDC nº 166/2017 (Art. 49). Já o LQ corresponde à menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, nas mesmas condições experimentais, conforme o Art. 55 da referida normativa.

Neste estudo, o LD e LQ foram estimados em 0,28 µg/mL e 0,85 µg/mL, respectivamente, evidenciando a adequada sensibilidade do método para a faixa de trabalho proposta.

5.1.5 Robustez

A robustez é um parâmetro que avalia a capacidade do método de manter seu desempenho diante de pequenas variações nas condições analíticas. Neste estudo, foi considerando alterações no tempo de preparo (24 h) e na composição do solvente (adição de 5% de etanol). Os resultados apresentados na Figura 29 foram expressos como média $\pm$ desvio padrão para as concentrações de 3, 6 e 9 µg/mL. No tempo pós-preparo, foram obtidos os valores de $2,94 \pm 0,04$; $5,27 \pm 0,20$; e $8,16 \pm 0,09$, respectivamente. Já na condição de adição de solvente, os resultados foram de $3,18 \pm 0,09$; $5,89 \pm 0,38$; e $8,69 \pm 0,44$, respectivamente. Diante disso, a análise do desvio padrão relativo (DPR%), associada ao teste t de Student, não evidenciou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), demonstrando que o método permanece estável e confiável sob condições ligeiramente modificadas, apresentando adequada robustez.

Figura 29 – Avaliação da robustez do método de UV-vis para quantificação de Nys sob pequenas variações nas condições de tempo de preparo e adição de solvente, expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três concentrações (baixa, média e alta)



Fonte: A autora.

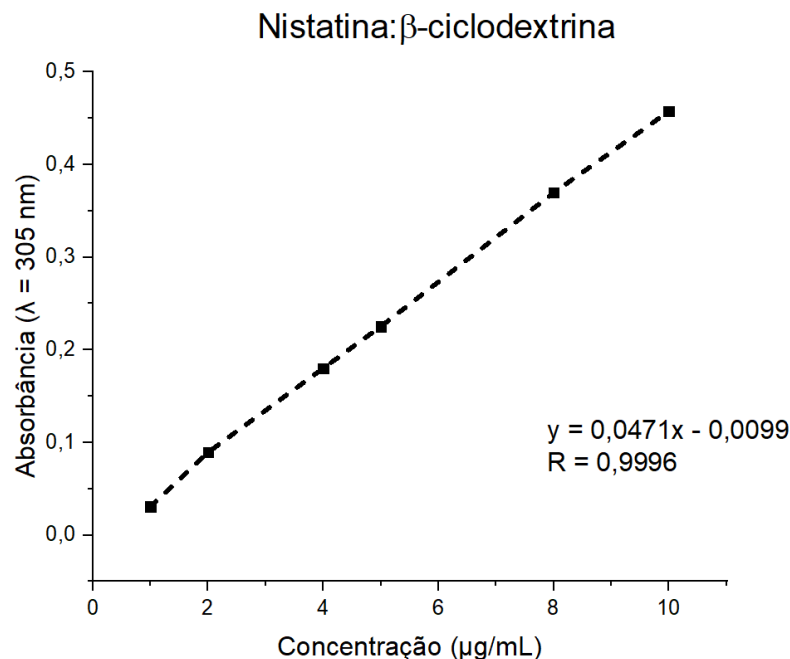
5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (UV-VIS) PARA QUANTIFICAÇÃO DO COMPLEXO NYS:βCD

5.2.1 Linearidade

Conforme demonstrado na Figura 28, a intensidade de absorção em 305 nm da Nys:βCD (0,2710) foi inferior à Nys (0,4184). Essa diferença espectrofotométrica evidenciou a necessidade de construção de uma curva analítica específica para o complexo de inclusão, uma vez que a utilização da curva obtida para a Nys poderia resultar em subestimação da concentração do fármaco.

A curva analítica de calibração da Nys:βCD (Figura 30) apresentou comportamento linear no intervalo de 1 a 10 µg/mL, com coeficiente de correlação ($R = 0,9996$), indicando forte correlação entre concentração e absorbância. A equação da reta obtida foi $y = 0,0471x - 0,0099$, evidenciando adequada sensibilidade do método.

Figura 30 – Curva de calibração da Nys:βCD obtida por UV-Vis a 305 nm, relacionando a absorbância com a concentração (1–10 µg/mL)



Fonte: A autora.

Para avaliar a uniformidade das variâncias entre os diferentes níveis de concentração, a homocedasticidade foi determinada por meio do teste de Cochran. Os resultados indicaram comportamento homocedásticos, evidenciando variância constante ao longo da faixa analisada. Assim, a aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) mostrou-se mais adequada para o ajuste dos dados experimentais.

A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk, obtendo-se valor de $W = 0,954$, superior ao valor crítico tabelado (0,897; 95% de confiança), confirmando que os resíduos seguem distribuição normal e atendem às premissas da regressão linear.

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que o modelo foi estatisticamente significativo, com valor de F calculado (19839) superior ao F tabelado (4,494) e valor de $p < 0,001$, indicando que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero (Tabela 5). Isso demonstra adequada relação linear entre concentração e absorbância na faixa avaliada. Esses resultados confirmam a linearidade do método para quantificação do complexo Nys:βCD.

Tabela 5 – Resultado do teste F da Anova para determinação da significância do coeficiente angular para a nistatina:β-ciclodextrina

Parâmetro	Valor	F calculado	F tabelado (95%)	p-valor
Regressão	0,3986	19895,89	4,49	p < 0,001

Fonte: A autora.

5.2.2 Precisão e exatidão

O método desenvolvido para quantificação da Nys:βCD mostrou adequada precisão intradia e interdia, com valores de DPR% inferiores a 6,33% em todas as concentrações avaliadas. O teste t de Student não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os valores experimentais e teóricos ($p > 0,05$), demonstrando boa reprodutibilidade do método.

Na exatidão os valores permaneceram dentro da faixa aceitável para matrizes complexas e baixa concentração, ficando a média entre 98,3% e 102,5%, isso evidencia adequada concordância entre as concentrações determinadas e os valores teóricos.

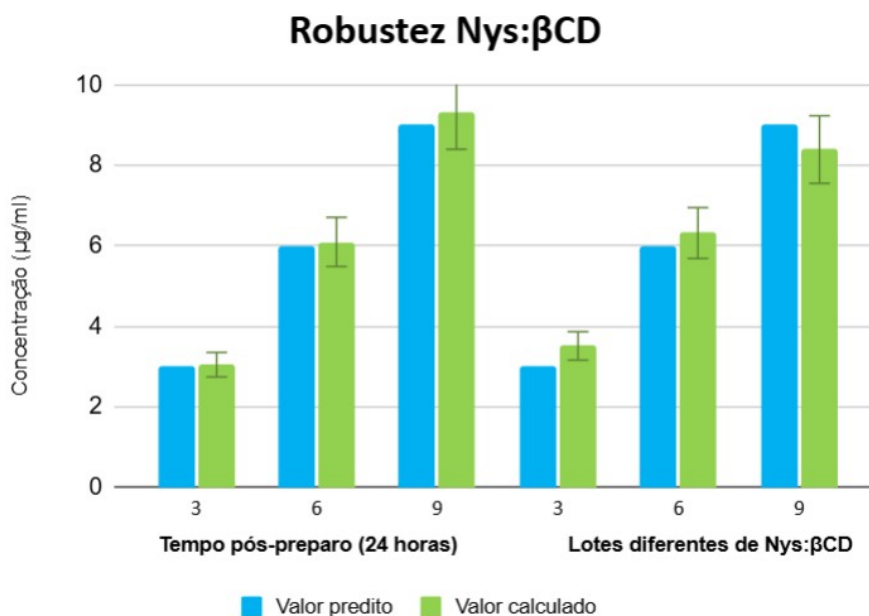
5.2.3 Limite de detecção e quantificação

Os LD e LQ obtidos para a Nys:βCD foram de 0,14 µg/mL e 0,42 µg/mL, respectivamente, permitindo a detecção e quantificação confiável do complexo sob as condições experimentais estabelecidas.

5.2.4 Robustez

A robustez do método foi confirmada através de variações no experimento, incluindo análise após 24 h de preparo e utilização de diferentes lotes do complexo Nys:βCD como mostrado na Figura 31. Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), indicando estabilidade e confiabilidade do método sob condições analíticas ligeiramente modificadas.

Figura 31 – Avaliação da robustez do método de UV-vis para quantificação de Nys:βCD sob pequenas variações nas condições de tempo de preparo e lotes diferentes de Nys:βCD, expressos pela média ± desvio padrão de três concentrações (baixa, média e alta)



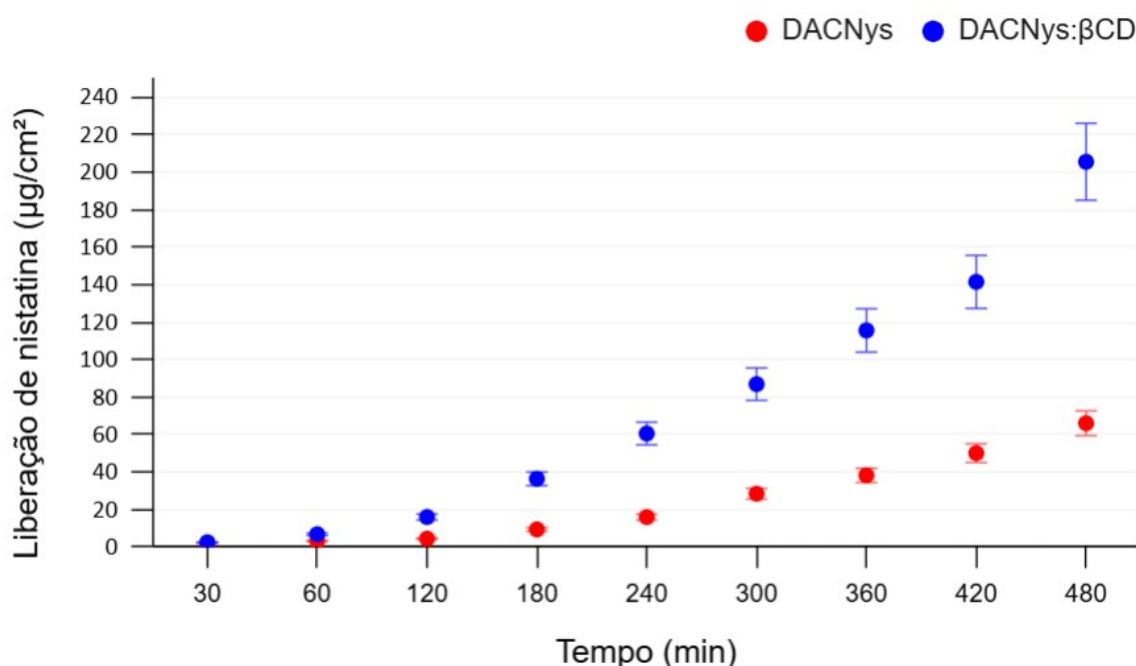
Fonte: A autora.

5.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ

O perfil de liberação in vitro a partir dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD mostrou aumento progressivo da quantidade cumulativa de Nys liberada em função do tempo para ambas os cremes adesivos, caracterizando um perfil dependente do tempo (Figura 32). Entretanto, diferenças quantitativas foram evidenciadas entre os sistemas avaliados. No tempo inicial de 30 min, a formulação DACNys apresentou valor de 2,01 µg/cm², enquanto DACNys:βCD apresentou 2,48 µg/cm² ($p > 0,05$). A partir de 60 min DACNys passou a apresentar liberação cumulativa inferior de forma consistente a DACNys:βCD.

Nos tempos de 60, 120, 180, 240 min, os valores de DACNys foram de 3,18; 4,42; 9,33 e 15,96; µg/cm² respectivamente, enquanto a formulação DACNys:βCD apresentou 6,77; 15,96; 36,36; 60,52 µg/cm², no mesmo intervalo ($p > 0,05$). A partir de 300, 360, 420 e 480 min, DACNys atingiu, respectivamente, 28,39; 38,19; 50,05; 65,99 µg/cm², enquanto a DACNys:βCD apresentou 86,85; 115,51; 141,43; 205,49 µg/cm² no mesmo período ($p > 0,05$). A diferença estatisticamente significativa foi encontrada apenas nos tempos de 360, 420, 480 min ($p = 0,0051$; $p = 0,0006$; $p < 0,0001$, respectivamente).

Figura 32 – Perfil de liberação in vitro da Nys a partir dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD ao longo de 480 min, avaliado em células de difusão de Franz



DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina. Fonte: A autora.

5.3.1 Ajuste aos modelos cinéticos de liberação

A seleção do modelo de ajuste baseou-se no maior coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.), no maior critério de seleção de modelo (MSC, model selection criterion) e no menor critério de informação de Akaike (AIC) (Costa; Sousa Lobo, 2001). Os parâmetros de ajuste dos modelos cinéticos testados para o perfil de liberação de DACNys e DACNys:βCD estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de ajuste dos modelos cinéticos testados para o perfil de liberação de DACNys e DACNys:βCD

Modelo	DACNys			DACNys:βCD		
	R^2 aj.	AIC	MSC	R^2 aj.	AIC	MSC
Ordem zero	0,8771	-5,69	1,87	0,8959	12,63	2,04
Primeira ordem	0,8755	-5,57	1,86	0,8914	13,01	2,00
Higuchi	0,6093	4,72	0,72	0,6340	23,94	0,78
Korsmeyer–Peppas	0,9965	-36,79	5,330	0,9913	-8,95	4,438
Weibull	0,9965	-36,79	5,330	0,9910	-8,61	4,400

Fonte: elaborado pela autora, a partir dos dados de ajuste gerados no DDSolver (2026).

Os modelos de Korsmeyer–Peppas e Weibull apresentaram os maiores valores de R^2 aj. e MSC e os menores valores de AIC para ambas as formulações,

indicando melhor ajuste aos perfis de liberação em comparação aos modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi. Para o DACNys, os valores dos critérios de ajuste dos modelos de Korsmeyer–Peppas e Weibull foram equivalentes na precisão apresentada na Tabela . Para o DACNys:βCD, o modelo de Korsmeyer–Peppas apresentou $R^2_{aj.} = 0,9913$, $AIC = -8,95$ e $MSC = 4,438$, enquanto o modelo de Weibull apresentou $R^2_{aj.} = 0,9910$, $AIC = -8,61$ e $MSC = 4,400$.

Tabela 7 – Parâmetros do modelo de Korsmeyer–Peppas ($F = kKP \cdot t^n$) ajustado aos dados de liberação

Formulação	kKP	n	Mecanismo de liberação
DACNys	$1,35 \times 10^{-7}$	1,918	Transporte Super Caso II
DACNys:βCD	$8,78 \times 10^{-7}$	1,792	Transporte Super Caso II

Fonte: elaborado pela autora, a partir dos dados de ajuste gerados no DDSolver (2026).

O expoente de liberação (n) do modelo de Korsmeyer–Peppas foram superiores a 1 (Tabela 7), sendo, de acordo com a classificação do modelo, compatíveis com transporte Super Caso II. No modelo de Weibull, os parâmetros de forma β foram 1,929 para o DACNys e 1,820 para o DACNys:βCD. Valores de $\beta > 1$ são característicos de perfis sigmoidais, indicando uma fase inicial de menor taxa de liberação seguida por aumento da taxa de liberação.

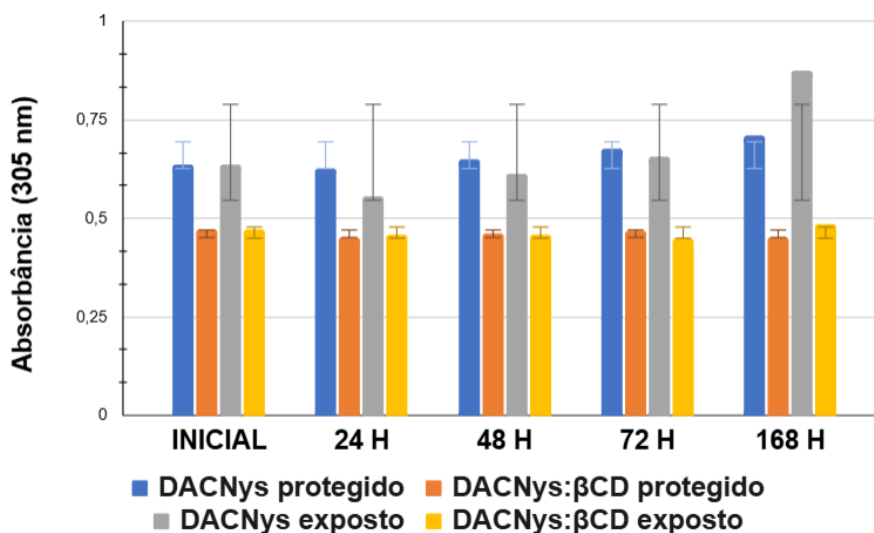
5.4 FOTOESTABILIDADE

Considerando os resultados obtidos, observa-se na Figura 33 e Tabela 8 a formulação DACNys apresentou maiores variações nos valores de absorbância e, consequentemente, no teor de Nys ao longo do período experimental, especialmente nas amostras submetidas à exposição à luz. Os dados mostram que, já no tempo 0 (inicial), a incorporação da Nys ao adesivo resultou em uma perda média de aproximadamente 10% da massa do fármaco, evidenciando a instabilidade do fármaco livre. No grupo exposto, os valores médios de teor passaram de cerca de 90,6% no tempo 0 para 80,5% após 24 h, alcançando 123,5% em 168 h, o que sugere oscilações importantes na quantificação e possível influência de fatores relacionados à degradação, homogeneidade da amostra ou variabilidade analítica. No grupo protegido da luz, embora os valores tenham permanecido mais elevados, também

foram observadas variações ao longo do período experimental, com média de 88,6% em 24 h e 99,2% em 168 h.

Em contraste, a formulação DACNys:βCD demonstrou menor variação desses parâmetros, sugerindo maior estabilidade do fármaco frente às condições de exposição avaliadas. Os valores médios permaneceram próximos aos observados no tempo inicial (99,1%), variando entre 95,0% e 99,7% nas amostras expostas à luz e entre 96,5% e 99,7% nas amostras protegidas. Ao final do período experimental, a formulação manteve aproximadamente 99,5% do valor inicial em ambas as condições de armazenamento.

Figura 33 – Média $\pm$ desvio-padrão da absorbância dos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD expostos à radiação UV-C por 0, 24, 48, 72 e 168 h



DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina. Fonte: A autora.

Tabela 8 – Teor remanescente de nistatina (%) nos cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD armazenadas sob exposição e proteção à luz

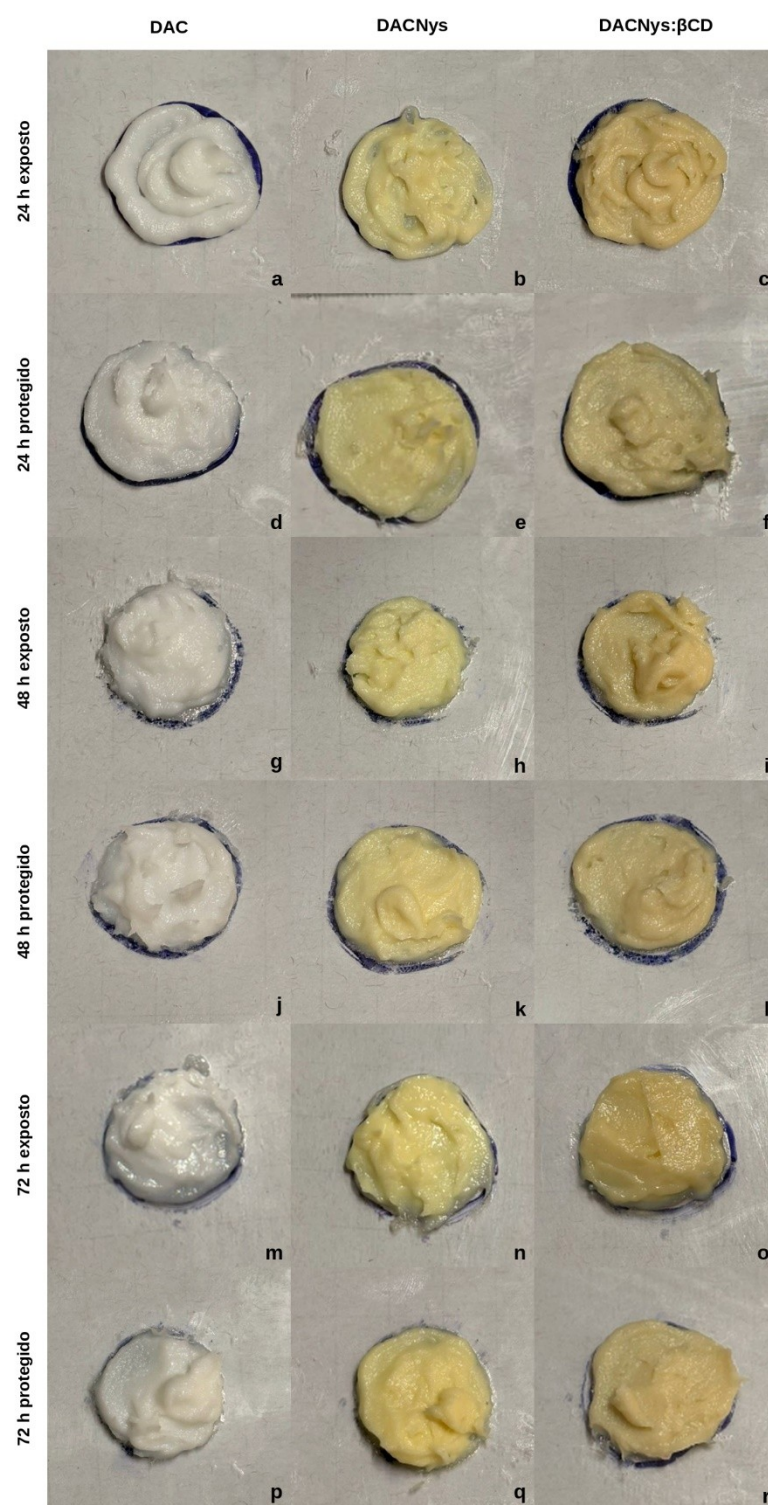
Tempo	DACNys Exposto (%)	DACNys:βCD Exposto (%)	DACNys Protegido (%)	DACNys:βCD Protegido (%)
0 h	90,6	99,1	90,6	99,1
24 h	80,5	96,5	88,6	96,5
48 h	87,3	96,0	89,1	97,4
72 h	96,8	97,5	96,3	97,8
168 h	123,5	97,8	99,2	97,0

DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina. Fonte: A autora.

5.4.1 Avaliação organoléptica e visual

Quanto à avaliação organoléptica, os cremes adesivos, tanto expostos à radiação UV-C quanto protegidos, não apresentaram alterações de cor, odor, separação de fases ou homogeneidade nos tempos inicial, 24 h e 48 h, mantendo os escores basais em todos os parâmetros avaliados (escore 0 para cor, odor, separação de fases e homogeneidade; escore 2, consistência adequada, em todos os grupos) (Figura 34). Após 72 h de exposição à radiação UV-C, as formulações DACNys e DACNys:βCD apresentaram alteração na homogeneidade, com presença de pequenos grumos (escore 2), enquanto o DAC manteve-se inalterado (Figura 34 e Figura 35). Nas amostras protegidas, nenhuma alteração organoléptica foi observada em nenhum dos tempos avaliados, para nenhuma das formulações (Tabela 9).

Figura 34 – Registros fotográficos padronizados (distância fixa de 20 cm) dos cremes adesivos DAC, DACNys e DACNys:βCD, nas condições exposta e protegida da radiação UV-C, nos tempos de 24, 48 e 72 h: a–c) 24 h exposto; d–f) 24 h protegido; g–i) 48 h exposto; j–l) 48 h protegido; m–o) 72 h exposto; p–r) 72 h protegido



DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina. Fonte: A autora.

Figura 35 – Detalhe do creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina: β -ciclodextrina (DACNys: β CD) após 72 h de exposição à radiação UV-C, evidenciando a presença de pequenos grumos na superfície, caracterizando a alteração no parâmetro homogeneidade (escore 2) descrita na Tabela 3



Fonte: A autora.

Tabela 9 – Escores da avaliação organoléptica dos cremes adesivos expostos e protegidos da radiação UV-C

Tempo	Condição	Formulação	Cor	Odor	Separação de fases	Consistência	Homogeneidade
Inicial	—	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	0
		DACNys	0	0	0	2	0
24 h	Exposto	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	0
		DACNys	0	0	0	2	0
24 h	Protegido	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	0
		DACNys	0	0	0	2	0
48 h	Exposto	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	0
		DACNys	0	0	0	2	0
48 h	Protegido	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	0
		DACNys	0	0	0	2	0
72 h	Exposto	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	2
		DACNys	0	0	0	2	2
72 h	Protegido	DAC	0	0	0	2	0
		DACNys: β CD	0	0	0	2	0
		DACNys	0	0	0	2	0

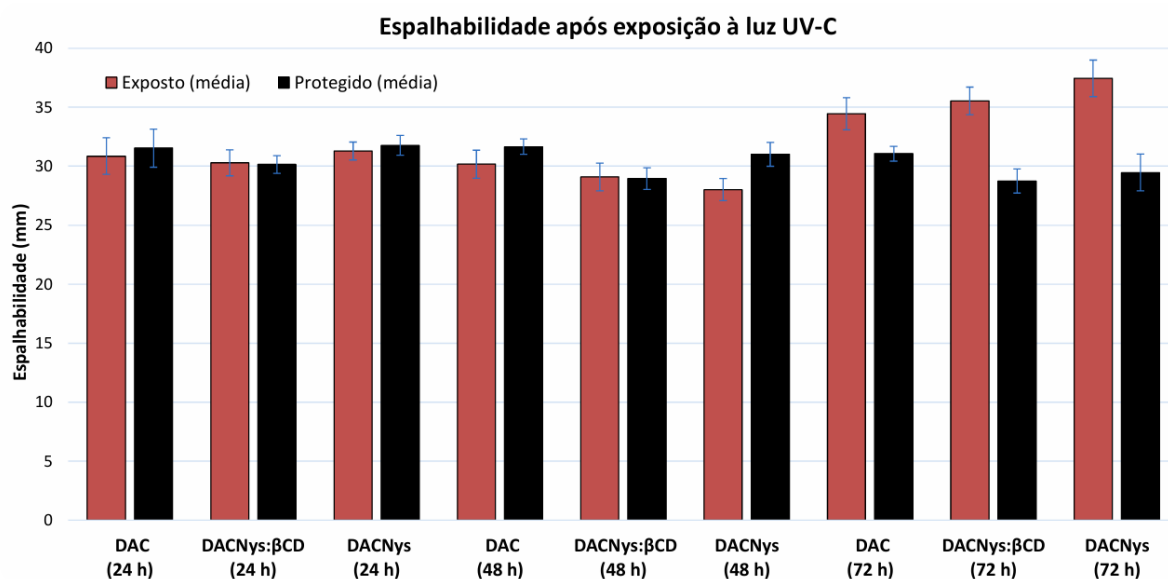
DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys: β CD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina: β -ciclodextrina. Escores conforme critérios da Tabela 3 (0–3 para cor, odor, separação de fases e homogeneidade; 0–4 para consistência).

Fonte: A autora.

5.4.2 Espalhabilidade

Em relação à espalhabilidade (Figura 36), os cremes adesivos expostos à radiação UV-C apresentaram valores semelhantes aos seus respectivos controles protegidos após 24 h de exposição. Em 48 h, a formulação DACNys:βCD manteve comportamento semelhante entre as condições exposta e protegida, enquanto DAC e, principalmente, DACNys apresentaram redução da espalhabilidade quando expostas em comparação aos seus controles protegidos. Já em 72 h, todas as formulações expostas apresentaram aumento da espalhabilidade em relação às respectivas amostras protegidas.

Figura 36 – Espalhabilidade (média $\pm$ desvio padrão) das formulações DAC, DACNys e DACNys:βCD em função do tempo (24 h, 48 h e 72 h), nos períodos exposto e protegido à luz UV-C



DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina. Fonte: A autora.

5.4.3 Determinação de pH

A determinação do pH demonstrou que os valores dos cremes adesivos permaneceram constantes ao longo do período de avaliação (Tabela 10), independentemente da condição experimental. De modo geral, os valores de pH permaneceram próximos à neutralidade durante todo o período experimental, variando de 7,07 a 7,42. Esses resultados indicam que a exposição às condições

experimentais avaliadas não promoveu alterações relevantes no pH dos cremes adesivos.

Tabela 10 – Valores de pH dos cremes adesivos DAC, DACNys:βCD e DACNys, avaliados nos diferentes tempos e condições experimentais. Os valores são apresentados como média (desvio-padrão)

Tempo	Condição	DAC	DACNys:βCD	DACNys
Inicial	—	7,16 (0,12)	7,09 (0,11)	7,07 (0,07)
24 h	Protegido	7,38 (0,07)	7,21 (0,29)	7,42 (0,28)
24 h	Exposto	7,38 (0,12)	7,12 (0,38)	7,29 (0,21)
48 h	Protegido	7,28 (0,23)	7,07 (0,10)	7,39 (0,32)
48 h	Exposto	7,27 (0,06)	7,17 (0,25)	7,38 (0,28)
72 h	Protegido	7,28 (0,10)	7,19 (0,25)	7,19 (0,04)
72 h	Exposto	7,20 (0,08)	7,07 (0,07)	7,25 (0,12)

Fonte: A autora.

5.5 DIFUSÃO EM ÁGAR

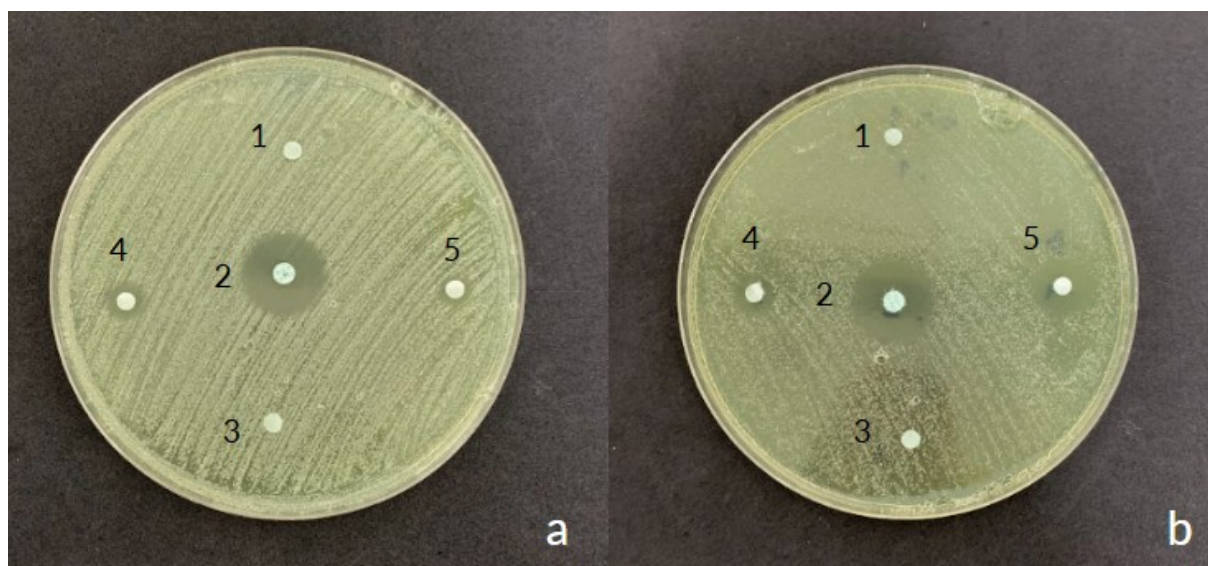
Zonas de inibição foram observadas em 100% das placas tratadas com DACNys e DACNys:βCD. Após 3 h, DACNys apresentou a maior média de zona de inibição ($11,63 \pm 1,72$ mm), seguido pelo DACNys:βCD ($7,71 \pm 0,75$ mm). Após 6 h, ambos os adesivos demonstraram aumento da atividade antifúngica, com zonas de inibição de $12,08 \pm 1,40$ mm para o DACNys e $11,04 \pm 1,25$ mm para o DACNys:βCD. Os cremes adesivos DAC e UCC não apresentaram atividade antifúngica, apresentando valores nulos (0 mm) em ambos os tempos avaliados (Figura 37). O fluconazol, utilizado como controle positivo, apresentou zonas de inibição dentro da faixa esperada. A análise estatística mostrou diferença significativa entre DACNys e DACNys:βCD em 3 h, mas não em 6 h (Tabela 11).

Tabela 11 – Zonas de inibição de crescimento (mm) de *C. albicans* promovido pelos extratos dos cremes adesivos DACNys, DACNys:βCD, DAC e UCC obtidos nos tempos de liberação de 3 h e 6 h, em meio de cultura RPMI

	3 h	6 h
DAC	0	0
DACNys	$11,63 \pm 1,72$ A	$12,08 \pm 1,40$ A
DACNys:βCD	$7,71 \pm 0,75$ B	$11,04 \pm 1,25$ A
UCC	0	0

*Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na mesma linha ($p < 0,05$). Siglas: DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina; UCC: Ultra Corega Creme Sem Sabor®. Fonte: A autora.

Figura 37 – Zonas de inibição do crescimento de *C. albicans* após difusão dos fármacos em meio RPMI, após (a) 3 h e (b) 6 h de incubação. Tratamentos aplicados em cada disco de filtro: (1) DAC, (2) Fluconazol 25 µg (controle positivo), (3) UCC, (4) DACNys e (5) DACNys:βCD



Fonte: A autora.

5.6 ATIVIDADE METABÓLICA DE BIOFILME DE *C. albicans* FORMADO NO FUNDO DE POÇOS

Os resultados do ensaio de viabilidade do biofilme de *C. albicans*, formado no fundo dos poços das placas de 96 poços e avaliado pelo método de redução do sal de tetrazólio XTT, no período de 3 e 6 h estão apresentados na Tabela 12. Os cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD reduziram significativamente a atividade metabólica de *C. albicans* em 3 h (95,91% e 97,03%, respectivamente), mantendo reduções superiores a 98% após 6 h.

A NysOS apresentou efeito intermediário, com reduções de 83,75% em 3 h e 84,01% em 6 h. Em contraste, a formulação base DAC exibiu valores negativos (-19,50% e -7,11%), indicando ausência de efeito antifúngico. O creme adesivo comercial UCC, também não demonstrou atividade relevante, apresentando reduções negativas de -10,58% (3 h) e -3,99% (6 h).

A análise estatística mostrou que DACNys e DACNys:βCD apresentaram maior redução da viabilidade metabólica que DAC e UCC ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre DACNys e DACNys:βCD ($p > 0,05$). NysOS não diferiu significativamente de DACNys, DACNys:βCD, DAC ou UCC ($p > 0,05$). DAC e UCC também não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Tabela 12). Na comparação entre os tempos, nenhuma formulação apresentou diferença significativa entre 3 e 6 h após a correção de Bonferroni ($\alpha = 0,01$).

Tabela 12 – Percentual de redução da viabilidade metabólica do biofilme de *C. albicans* pelo ensaio XTT nos tempos de 3 h e 6 h

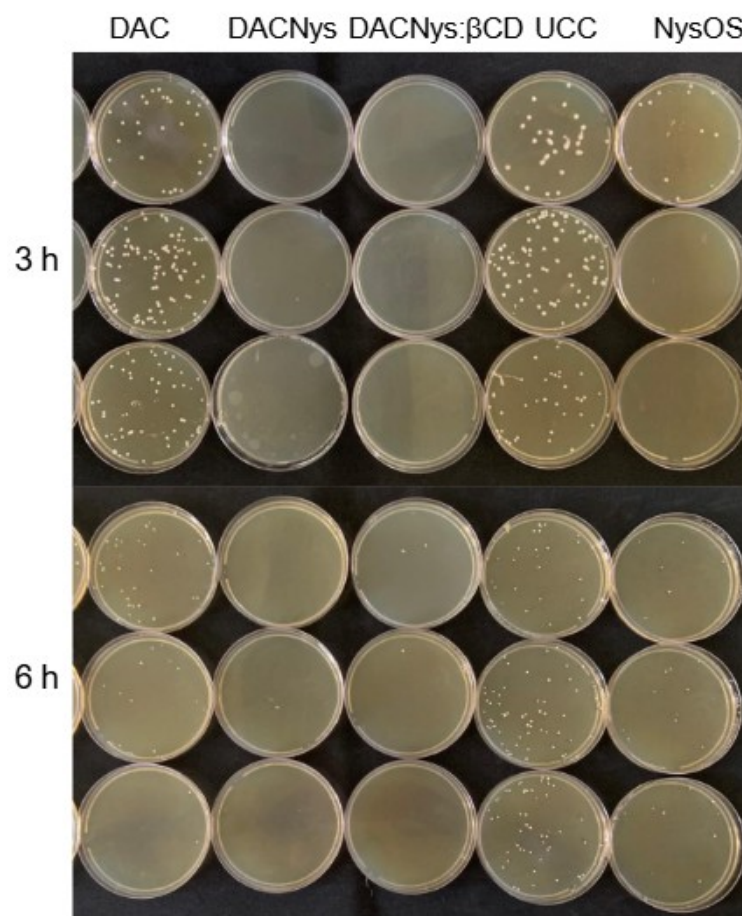
	DAC (%)	DACNys (%)	DACNys:βCD (%)	UCC (%)	NysOS (%)
3 h	-19,5 B	95,91 A	97,03 A	-10,58 B	83,75 AB
6 h	-7,11 B	98,04 A	98,20 A	-3,99 B	84,01 AB

*Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na mesma linha ($p < 0,05$). DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina; UCC: Ultra Corega Creme Sem Sabor®; NysOS: suspensão oral de nistatina. Os valores negativos representam crescimento celular. Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si (teste de Kruskal-Wallis seguido de post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni, $p > 0,05$). Fonte: A autora.

Os resultados da contagem de células planctônicas viáveis, expressos em $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ nos sobrenadantes dos poços, estão apresentados na Tabela 13. Os cremes adesivos DACNys e DACNys:βCD promoveram a inibição completa do crescimento detectável de *C. albicans* nos tempos de 3 e 6 h, sem detecção de UFC/mL (Figura 38). O grupo UCC apresentou contagens de $6,65 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ em 3 h e $6,77 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ em 6 h, valores próximos aos observados no grupo controle DAC, que apresentou $6,69$ e $6,74 \log_{10}(\text{UFC/mL})$, respectivamente. A NysOS apresentou atividade antifúngica parcial, com contagens de $2,79 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ em 3 h e $3,57 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ em 6 h, indicando uma redução substancial da carga fúngica em comparação aos grupos DAC e UCC, embora sem promover a inibição completa do crescimento detectável.

Na estatística de contagem de UFC/mL, DACNys, DACNys:βCD e NysOS foram semelhantes entre si e diferentes de DAC e UCC em 3 h ($p < 0,05$). Já em 6 h, DACNys, DACNys:βCD e NysOS não apresentaram diferença estatística entre si, nem NysOS diferiu de DAC e UCC ($p > 0,05$); apenas DAC e UCC continuaram diferindo de DACNys e DACNys:βCD ($p < 0,05$).

Figura 38 – Quantificação de células planctônicas viáveis, expressa em UFC/mL, nos sobrenadantes dos poços após os tratamentos submetidos à liberação do fármaco em meio RPMI por 3 h e 6 h



Fonte: A autora.

Tabela 13 – Contagem de células planctônicas viáveis de *C. albicans* nos sobrenadantes dos poços, expressa em $\log_{10}$ (UFC/mL), após 3 e 6 h de exposição aos tratamentos em meio RPMI

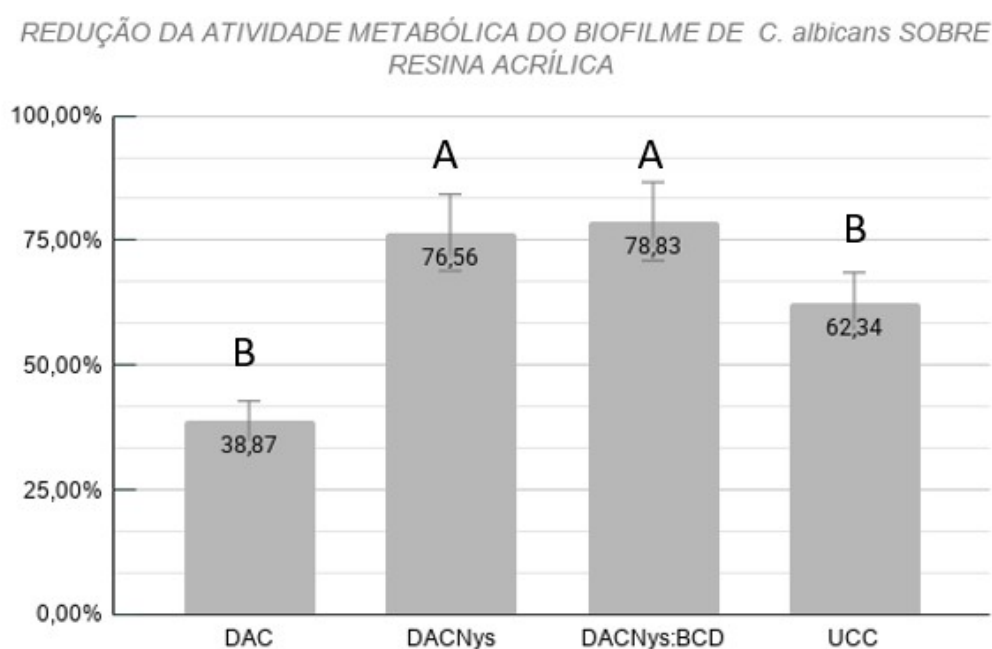
	DAC (UFC/mL)	DACNys (UFC/mL)	DACNys:βCD (UFC/mL)	UCC (UFC/mL)	NysOS (UFC/mL)
3 h	6,69 B	Não detectado A	Não detectado A	6,65 B	2,79 A
6 h	6,74 B	Não detectado A	Não detectado A	6,77 B	3,57 AB

*Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na mesma linha ($p < 0,05$). DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina; UCC: Ultra Corega Creme Sem Sabor®; Nys: suspensão oral de nistatina. Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni; $p < 0,05$). Fonte: A autora.

5.7 ATIVIDADE METABÓLICA DE BIOFILME DE *C. albicans* FORMADO SOBRE ESPÉCIMES DE RESINA ACRÍLICA

Os resultados da viabilidade do biofilme de *C. albicans*, formado sobre espécimes de resina acrílica, tratados por 6 h e avaliados pelo método de redução do sal de tetrazólio XTT, estão apresentados na Figura 39. Todos os tratamentos promoveram redução da atividade metabólica. As maiores reduções foram observadas para DACNys: β CD (78,83%) e DACNys (76,56%), sem diferença significativa entre si. UCC apresentou redução de 62,34%, enquanto DAC apresentou a menor redução (38,87%). Os grupos UCC e DAC diferiram significativamente de DACNys e DACNys: β CD, que apresentaram maiores percentuais de redução da atividade metabólica.

Figura 39 – Percentual de redução da atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* em espécimes de resina acrílica após tratamento por 6 h com os respectivos tratamentos, avaliado pelo ensaio XTT

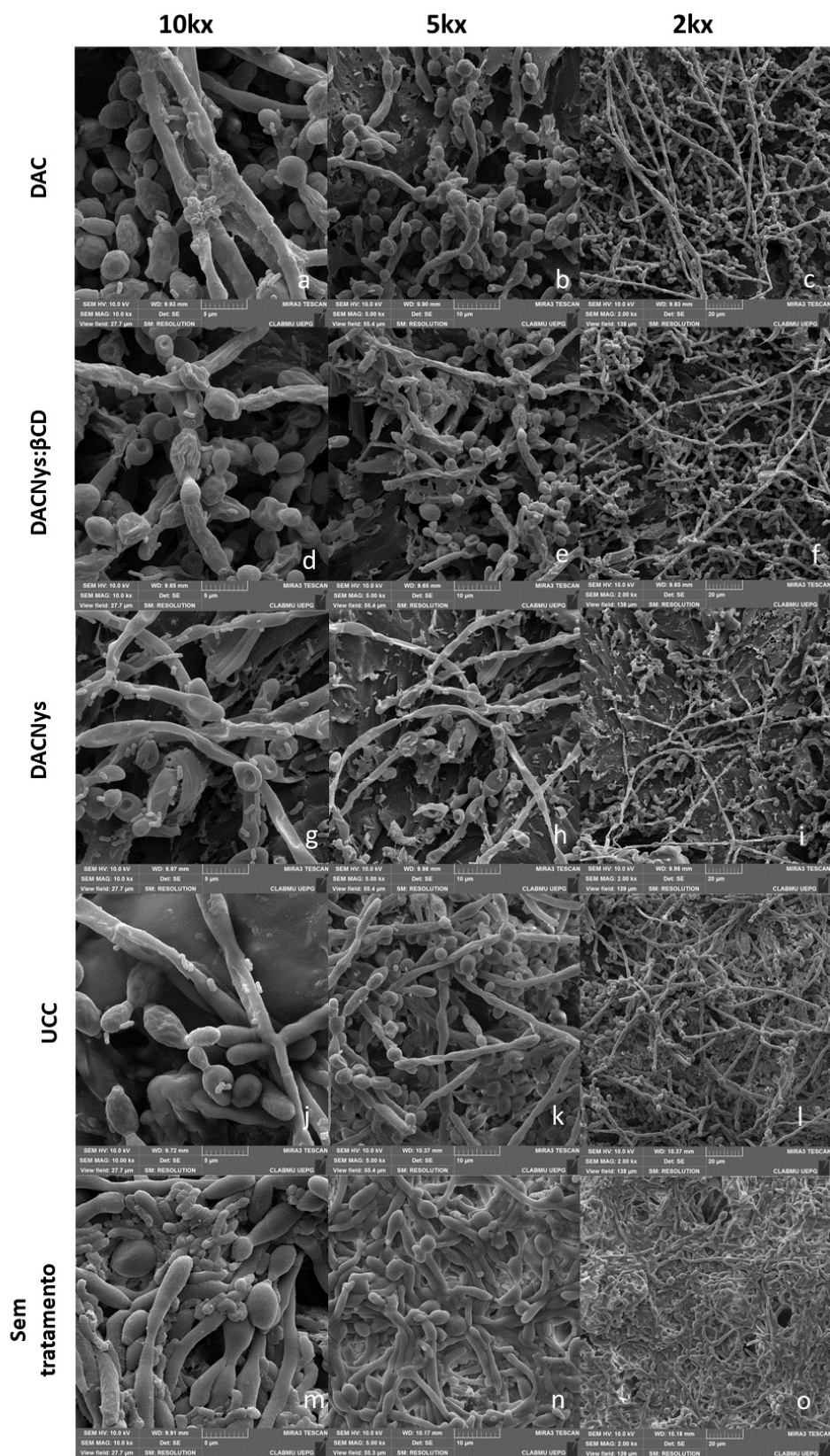


Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente entre si (teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys: β CD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina: β -ciclodextrina; UCC: Ultra Corega Creme Sem Sabor®. Fonte: A autora.

As imagens obtidas por MEV evidenciaram essas diferenças morfológicas entre os grupos avaliados. O controle positivo, composto apenas por *C. albicans* e meio de crescimento, observou-se intenso desenvolvimento de biofilme, com elevada presença de blastoconídios e estruturas filamentosas compatíveis com pseudo-hifas

aderidas à superfície analisada (Figura 40 m–o). De forma semelhante, os grupos DAC (Figura 40 a–c) e UCC (Figura 40 j–l) apresentaram colonização fúngica aderida à matriz polimérica, com células íntegras, superfície regular e estruturas filamentosas preservadas.

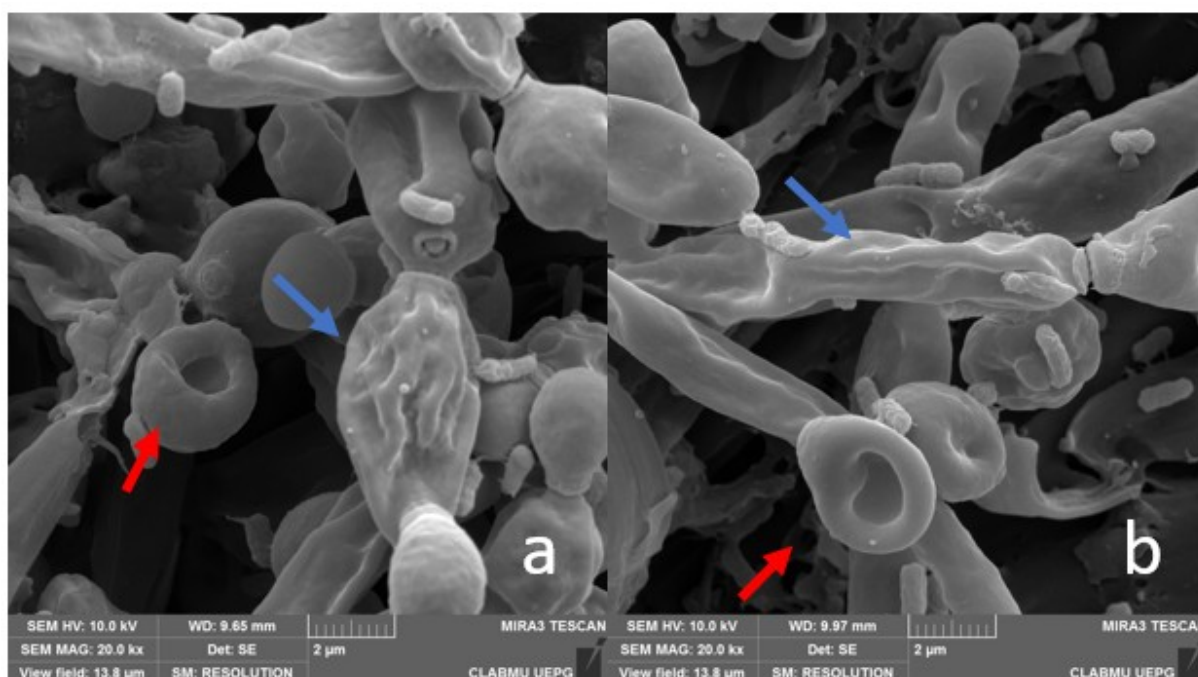
Figura 40 – Imagens obtidas por MEV dos espécimes de resina acrílica tratados com os cremes adesivos DAC, DACNys, DACNys:βCD e UCC, bem como do grupo controle de *C. albicans*, em diferentes aumentos (10k×, 5k× e 2k×)



Fonte: A autora.

Já os grupos tratados com DACNys (Figura 40 g–i) e DACNys:βCD (Figura 40 d–f) apresentaram menor densidade celular e redução das estruturas filamentosas quando comparados aos demais grupos. As micrografias evidenciaram alterações morfológicas compatíveis com dano celular, incluindo deformações estruturais, colapso de blastoconídios e desorganização das pseudo-hifas (Figura 41 a, b), sugerindo comprometimento da integridade celular fúngica e efeito antifúngico da Nys incorporada às formulações. Esses achados morfológicos estão em concordância com os resultados quantitativos de atividade metabólica do biofilme. O grupo DACNys:βCD apresentou a maior redução da atividade metabólica (79,31%), seguido do grupo DACNys (76,92%), corroborando o efeito antifúngico observado nas micrografias de MEV.

Figura 41 – Imagens obtidas por MEV de *C. albicans* no aumento de 20.000×, após tratamento com: a) DACNys:βCD; b) DACNys. As setas azuis indicam alterações morfológicas observadas nas estruturas filamentosas e celulares, enquanto as setas vermelhas destacam blastoconídios com aspecto compatível com deformação estrutural



Fonte: A autora.

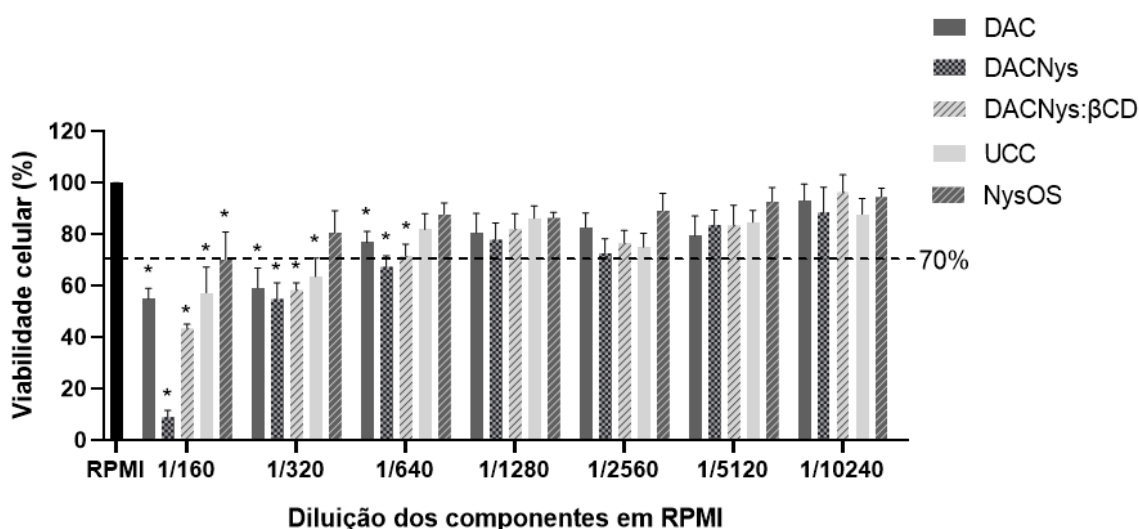
5.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (MTT)

A análise da viabilidade de fibroblastos 3T3 em resposta aos diferentes tratamentos demonstrou que a redução da viabilidade celular foi dependente da diluição dos componentes em RPMI, sendo mais acentuada nas concentrações mais elevadas (Figura 42). Nas diluições de 1/160 e 1/320, o DACNys apresentou os

menores valores de viabilidade celular dentre todos os grupos avaliados, chegando a valores próximos de 10% na diluição 1/160. O DACNys:βCD também apresentou redução da viabilidade nessas diluições, porém em magnitude inferior à observada para o DANys. O DAC, formulação isenta de fármaco, apresentou viabilidade celular reduzida nas diluições mais concentradas, em magnitude semelhante à do DACNys:βCD e do UCC. O UCC e o NysOS apresentaram os maiores valores de viabilidade celular dentre os grupos testados nas diluições de 1/160 a 1/640, mantendo-se próximos ou acima de 70% já a partir da diluição 1/640.

A partir da diluição 1/1280, todos os grupos apresentaram viabilidade celular acima de 70%, e a análise estatística não evidenciou diferenças significativas entre os materiais nas diluições de 1/1280 a 1/10240 ($p > 0,05$). Em relação ao controle negativo (RPMI), foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para a maioria dos grupos nas diluições mais concentradas, com exceção do UCC e do NysOS na diluição 1/640, que não diferiram significativamente do RPMI ($p > 0,05$).

Figura 42 – Média $\pm$ desvio padrão da viabilidade celular (%) após exposição aos cremes adesivos, determinada pelo ensaio de MTT



Cada barra representa a média de quatro experimentos independentes $\pm$ o erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguida pelo teste pós-hoc de Tukey. * $p < 0,05$ em comparação ao RPMI. RPMI: meio de cultura RPMI-1640 (controle negativo); DAC: creme adesivo experimental sem incorporação de fármaco (controle); DACNys: creme adesivo experimental incorporado com nistatina; DACNys:βCD: creme adesivo experimental incorporado com nistatina:β-ciclodextrina; UCC (Ultra Corega® Creme – adesivo protético comercial); NysOS: suspensão oral de nistatina (tratamento padrão-ouro). O RPMI foi utilizado sem diluição em todas as concentrações de tratamento testadas. Fonte: A autora.

5.9 REMOÇÃO DOS CREMES ADESIVOS DE SUPERFÍCIE DE RESINA ACRÍLICA

Os percentuais de adesivo remanescente após os diferentes protocolos de higienização estão apresentados na Tabela 14. Menores valores indicam maior eficiência na remoção do adesivo da superfície do espécime. Para o adesivo DAC, a menor quantidade de material remanescente foi observada após a escovação com sabonete neutro com os valores de mediana de 0,55% e intervalo interquartil de 0,20–3,44, seguido pela imersão em Corega Tabs® associada à escovação [1,70% (0,00–6,80)], sem diferença significativa entre esses métodos ($p > 0,05$). Em contrapartida, a imersão isolada em Corega Tabs® resultou na maior porcentagem de adesivo remanescente [100,00% (98,85–100,00)], indicando menor eficácia de remoção. Para o adesivo DACNys:βCD, todos os métodos apresentaram baixos percentuais de material remanescente, sem diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). As menores medianas foram observadas após a imersão em Corega Tabs® associada à escovação [0,00% (0,00–0,80)] e a escovação com sabonete neutro [0,45% (0,00–1,50)]. No grupo DACNys, os menores percentuais de adesivo remanescente foram observados após a escovação com água destilada morna [0,42% (0,00–2,82)] e a imersão em Corega Tabs® associada à escovação [0,85% (0,00–6,10)], enquanto a imersão isolada em Corega Tabs® apresentou o maior percentual de material aderido [100,00% (100,00–100,00)], indicando baixa capacidade de remoção. Para o adesivo UCC, a escovação com sabonete neutro apresentou menor quantidade de material remanescente [3,45% (1,30–15,80)], enquanto a imersão isolada em Corega Tabs® resultou novamente nos maiores valores [100,00% (78,60–100,00)].

Tabela 14 – Percentual de adesivo remanescente após diferentes métodos de higienização, expresso em mediana e intervalo interquartil

	DAC	DACNys:βCD	DACNys	UCC
Escovação com água destilada morna	7,49 (0,00 – 18,71) B ab	0,66 (0,00- 2,17) A a	0,42 (0,00 – 2,82) A a	8,12 (0,96 – 39,07) B a
Escovação com sabonete neutro	0,55 (0,20 – 3,44) AB a	0,45 (0,00 – 1,50) A a	4,05 (0,00 – 18,60) BC a	3,45 (1,30 – 15,80) C a
Imersão em Corega Tabs + escovação	1,70 (0,00 – 6,80) AB a	0,00 (0,00 - 0,80) A a	0,85 (0,00 – 6,10) AB a	4,90 (0,10 – 28,20) B a
Escovação com creme dental convencional	5,35 (1,00 – 40,80) AB a	0,65 (0,10 – 45,20) A a	4,80 (0,00 – 21,80) AB ab	23,20 (5,10 – 100,00) B ab
Imersão em Corega Tabs	100,00 (98,85 – 100,00) A b	100,00 (43,60 – 100,00) A b	100,00 (100,00 – 100,00) A a	100,00 (78,60 – 100,00) A a

DAC: Creme adesivo experimental; DACNys: Creme adesivo experimental com nistatina; DACNys:βCD: Creme adesivo experimental com complexo de inclusão nistatina:β-ciclodextrina; UCC: Ultra Corega Creme Sem Sabor®; ** Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os métodos de higienização para um mesmo adesivo (Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni; $p < 0,05$). ***Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os adesivos para um mesmo método de higienização (Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni; $p < 0,05$). Fonte: A autora.

Na comparação entre os adesivos para cada protocolo de higienização, observaram-se diferenças significativas em alguns métodos. De modo geral, os adesivos experimentais contendo Nys ou o complexo nistatina:β-ciclodextrina apresentaram menores percentuais de material remanescente. A imersão isolada em Corega Tabs® mostrou-se pouco efetiva para a remoção dos adesivos avaliados, uma vez que os percentuais de material remanescente permaneceram elevados em todos os grupos.

6 DISCUSSÃO

A nistatina (Nys) tópica permanece a base terapêutica da estomatite protética, por sua eficácia e baixo custo (Almoyad, 2025; Rai *et al.*, 2022), mas a elevada recidiva ainda representa um desafio (Almoyad, 2025). Sistemas de liberação local controlada e sustentada, com menor número de aplicações diárias em razão da ação direcionada ao tecido-alvo e a diminuição dos efeitos sistêmicos adversos, têm alto potencial clínico. Para superar as limitações da suspensão oral de Nys, formulações mucoadesivas têm sido desenvolvidas com o objetivo de prolongar a retenção dos fármacos na cavidade oral. Desta forma, este estudo utilizou cremes adesivos protéticos, desenvolvidos por Meneghetti (2024a), capazes de carregar Nys em suas formas livre ou complexada (Nys: β CD) e se aderir tanto na mucosa como na resina acrílica de bases protéticas. Esses cremes são protegidos por depósito de patente junto ao INPI, sob os números BR 10 2024 016316 8 e BR 10 2024 016312 5 (Meneghetti *et al.*, 2024b, c), além de uma formulação para pacientes com hipossalivação, depositada sob o número BR 10 2024 016323 0 (Meneghetti *et al.*, 2024d).

O estudo iniciou-se com a avaliação analítica *in vitro* de cremes adesivos protéticos contendo Nys complexada à β -ciclodextrina (DACNys: β CD) ou Nys em sua forma livre (DACNys). A espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foi selecionada como método analítico por sua rapidez e baixo custo operacional, oferecendo, quando associada a um protocolo de validação rigoroso (RDC nº 166/2017, ANVISA), a confiabilidade e a seletividade necessárias para a quantificação do fármaco em matrizes complexas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), embora já sido utilizada em hidrogéis mucoadesivos contendo Nys complexada (Nys: β CD) ou livre (Garcia *et al.*, 2025), não pôde ser empregada neste estudo devido à composição dos cremes adesivos, que dificulta a separação dos interferentes e aumenta o risco de saturação da coluna cromatográfica. Desenvolveu-se, então, um método espectrofotométrico em UV-Vis para quantificar a Nys liberada *in vitro* de cada formulação experimental, com curvas analíticas específicas construídas para a Nys livre e complexada.

Tanto os espectros de Nys livre como de Nys: β CD exibiram o mesmo padrão de bandas múltiplas, característico de uma estrutura vibrônica, com três máximos de

absorção ($\lambda_{\text{máx}}$; 292, 305 e 320 nm) (Brescansin *et al.*, 2013). O $\lambda_{\text{máx}}$ em 305 nm foi mantido em ambas as curvas, indicando a ausência de deslocamentos hipsocrômico ($\lambda_{\text{máx}}$ deslocado para um comprimento de onda menor) ou batocrômico ($\lambda_{\text{máx}}$ deslocado para um comprimento de onda maior) e, portanto, que a complexação com β -ciclodextrina (β CD) não alterou significativamente a natureza eletrônica do cromóforo da Nys. Entretanto, em 305 nm e em concentração equimolar de Nys, o complexo Nys: β CD apresentou absorbância 35% menor que a Nys livre (0,2710 versus 0,4184), caracterizando um efeito hipocrômico (diminuição da intensidade de absorção). Esse comportamento é consistente com os achados de Somer *et al.* (2020), que, por meio de espectroscopia fotoacústica (PAS), avaliaram a interação entre a Nys e a β CD a partir das alterações na absorção na região do UV-Vis. Os autores atribuíram a principal interação à região heptaênica da Nys, uma vez que a complexação com a β CD promoveu redução da intensidade de absorção nessa região. Efeitos hipocrômicos também foram descritos para outros complexos de inclusão com β -ciclodextrina (Galindres-Jiménez *et al.*, 2025). Entretanto, até o presente momento, não foram identificados relatos específicos desse efeito no complexo Nys: β CD avaliado por espectroscopia UV-Vis, o que caracteriza um achado adicional deste estudo.

Os ensaios de liberação *in vitro* desempenham papel importante no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e no controle de qualidade, permitindo caracterizar o perfil de liberação do fármaco a partir da formulação (Zhang *et al.*, 2010). Do ponto de vista clínico, o desenvolvimento de um creme adesivo protético com propriedades antifúngicas e antibiofilme pode representar uma estratégia promissora para associar a fixação da prótese ao controle da infecção e à redução do biofilme em sua superfície, favorecendo a integração dessas funções à rotina de uso e higiene protética.

No presente estudo, ambos os cremes adesivos foram capazes de liberar a Nys ao longo do período avaliado. Entretanto, foram observadas diferenças na velocidade e na extensão da liberação, com maior quantidade cumulativa de Nys liberada pela formulação contendo o complexo Nys: β CD. Ao final do período de 480 min, a DACNys: β CD apresentou liberação cumulativa de 205,49 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, enquanto a DACNys atingiu 65,98 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondendo a uma liberação aproximadamente 3,1 vezes maior para a formulação contendo o complexo. Esse resultado é consistente com os achados de Garcia *et al.* (2025), que também observaram maior liberação da

Nys quando complexada em comparação à Nys livre, utilizando um sistema semelhante, com célula de Franz e quantificação por CLAE. Esse efeito pode estar relacionado à formação do complexo de inclusão, na qual a Nys é incorporada à cavidade hidrofóbica da β CD, favorecendo sua dispersão molecular no meio aquoso e reduzindo sua tendência à agregação. Consequentemente, a complexação pode aumentar sua solubilidade aparente e sua disponibilidade para difusão no meio receptor (Urban *et al.*, 2023). Apesar de ser um experimento *in vitro*, o meio receptor utilizado foi composto por uma solução hidroalcoólica a 10%, selecionada com a finalidade de se aproximar o ambiente bucal aquoso e, simultaneamente, garantir as condições sink necessárias para a condução do ensaio. Além disso, para garantir uma comparação justa e proporcional entre os sistemas, vale destacar que ambas os cremes adesivos apresentam massas equivalentes de ativo: cada grama de DACNys contém 17,5 mg de Nys, enquanto a DACNys: β CD contém 36 mg/g do complexo, o que equivale a 16,1 mg/g em massa de Nys livre (Urban *et al.*, 2023).

Diversos modelos matemáticos, que permitem caracterizar quantitativamente o comportamento de liberação, têm sido propostos para descrever a liberação de fármacos a partir de diferentes sistemas de administração, incluindo os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer–Peppas e Weibull (Zhang *et al.*, 2010). Nos cremes adesivos avaliados, os perfis de liberação apresentaram comportamento melhor descrito pelos modelos de Korsmeyer–Peppas e Weibull. No modelo de Korsmeyer–Peppas, os valores de n superiores a 1 foram compatíveis com o regime de transporte Super Caso II, sugerindo que a liberação da Nys pode envolver, além da difusão do fármaco, alterações estruturais da matriz durante o processo (Zhang *et al.*, 2010). Entretanto, considerando que o valor de n é dependente das características do sistema e das condições experimentais, esse resultado deve ser interpretado como indicativo do comportamento de liberação, e não como evidência isolada de um mecanismo específico. No modelo de Weibull, os valores de β de 1,929 para a DACNys e 1,820 para a DACNys: β CD caracterizaram perfis sigmoidais, com uma etapa inicial de liberação mais lenta, seguida por aumento da taxa de liberação (Zhang *et al.*, 2010). A proximidade desses valores indica comportamento temporal semelhante entre as formulações, apesar da maior quantidade de Nys liberada pela DACNys: β CD. Dessa forma, a complexação com a β CD parece ter aumentado a disponibilidade da Nys para liberação, sem modificar substancialmente o formato do perfil de liberação.

Paralelamente, os cremes adesivos foram avaliados quanto à fotoestabilidade por meio de exposição à radiação UV-C, utilizada para acelerar processos de degradação. De forma geral, DACNys:βCD apresentou a maior recuperação de fármaco Nys e menor variabilidade entre as amostras, independentemente da exposição à luz, indicando maior estabilidade do sistema. Esses resultados sugerem que a βCD manteve um efeito protetor na Nys mesmo após a sua incorporação na matriz adesiva, favorecendo a preservação do teor do fármaco. O efeito protetor da complexação com β-ciclodextrina contra a fotodegradação é bem documentado na literatura para diversos fármacos (di-hidropiridinas, tretinoína, amoxicilina, propranolol, diclofenaco, naproxeno, doxiciclina, entre outros), com reduções na velocidade de degradação, a depender do fármaco e da ciclodextrina (Ansolin *et al.*, 2014; Ioele *et al.*, 2017; Cirri *et al.*, 2023).

Por outro lado, a formulação contendo Nys livre apresentou comportamento distinto, com redução inicial da absorbância a 305 nm nas primeiras 24 h, seguida de aumento progressivo ao longo do período analisado, mais acentuado no grupo exposto à luz. A redução inicial é compatível com a degradação fotoquímica da Nys, caracterizada pela diminuição dos picos de absorbância do fármaco, conforme descrito por Hemmateenejad *et al.* (2014). Entretanto, esse estudo foi conduzido em solução de Nys em metanol, diferentemente da matriz complexa dos adesivos avaliados no presente estudo. O aumento subsequente da absorbância sugere, portanto, que outros fenômenos possam estar envolvidos. Uma limitação da espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda único é a impossibilidade de diferenciar a Nys intacta de seus produtos de degradação. Segundo Hemmateenejad *et al.* (2014), a fotodegradação da Nys ocorre por um mecanismo sequencial, com formação de produtos intermediários e finais que podem apresentar absorção na mesma região espectral utilizada para sua quantificação. Dessa forma, a absorbância medida a 305 nm pode não representar exclusivamente a Nys intacta, e os valores crescentes de recuperação calculados para a Nys livre podem ter sido influenciados pela formação desses produtos. Além disso, sua possível interação com componentes da matriz adesiva pode ter contribuído para as alterações espectrais observadas ao longo do tempo. Até o momento, não foram identificados estudos que avaliassem especificamente a influência da matriz de adesivos protéticos sobre o comportamento espectral dos produtos de fotodegradação da Nys, o que limita comparações diretas com os presentes resultados. Portanto, estudos adicionais utilizando técnicas

analíticas capazes de separar e identificar a Nys e seus produtos de degradação, como CLAE ou espectrometria de massas, são necessários para esclarecer os fenômenos envolvidos.

No que se refere às características organolépticas e à espalhabilidade, foram observadas alterações no grupo exposto à radiação UV-C após 72 h, incluindo aumento da espalhabilidade e formação de grumos. Embora a temperatura ambiente tenha sido controlada durante o experimento, a temperatura no interior do sistema de exposição não foi monitorada, constituindo uma limitação do estudo, de modo que não é possível confirmar se houve aquecimento significativo das formulações durante o ensaio. Ainda assim, essa hipótese é relevante: componentes lipídicos da matriz, como a vaselina sólida, possuem ponto de fusão relativamente baixo e comportamento termossensível conhecido, de modo que mesmo um aquecimento discreto poderia favorecer maior fluidez e espalhabilidade. De forma semelhante, o comportamento viscoelástico de adesivos de prótese é significativamente influenciado pela temperatura (Ramakrishnan *et al.*, 2024). Não foram localizados, entretanto, dados específicos sobre o comportamento dos polímeros e outros componentes da matriz adesiva sob variação térmica ou exposição à radiação UV-C, o que limita a extrapolação dessa hipótese para todos os componentes da formulação.

A formação de grumos foi observada exclusivamente no grupo exposto à radiação UV-C após 72 h, enquanto não foram identificadas alterações semelhantes no grupo protegido da luz. Esse resultado sugere que a embalagem com revestimento de alumínio pode ter contribuído para a proteção da matriz adesiva durante a exposição às condições de estresse fotoquímico (ICH, 1996). Entretanto, estudos adicionais são necessários para distinguir os efeitos decorrentes da radiação daqueles relacionados a possíveis variações de temperatura durante o ensaio. A utilização de métodos quantitativos de caracterização, como análise de textura instrumental (Al-Barghouthy *et al.*, 2025), associada ao monitoramento da temperatura durante a exposição, poderá fornecer informações mais precisas sobre as alterações nas propriedades mecânicas e reológicas dos cremes adesivos após a exposição à radiação UV-C.

Quanto ao pH, não foram observadas alterações entre as condições avaliadas ao longo do período de acompanhamento, independentemente da exposição à radiação UV-C ou da proteção à luz, mantendo-se os valores entre 7,0 e 7,5. Essa faixa é compatível com a atividade dos conservantes empregados (Simões; Veiga;

Vitorino, 2020) e mantém a formulação próxima à neutralidade, condição compatível com o ambiente oral (Aframian; Davidowitz; Benoliel, 2006) e relevante para a estabilidade da Nys (Somer *et al.*, 2020). Após a caracterização analítica e físico-química dos cremes adesivos adesivas, avaliou-se o impacto da Nys livre ou complexada sobre a atividade antifúngica por meio de ensaios microbiológicos.

Halos de inibição contra *C. albicans* foram observados em ambos os cremes adesivos contendo Nys, confirmando a atividade antifúngica mesmo após a incorporação ao creme adesivo. O maior halo do DACNys após 3 h, seguido de desempenho semelhante entre os cremes após 6 h, sugere que a complexação com β CD reduziu a disponibilidade inicial da Nys, sem comprometer sua atividade antifúngica. A menor disponibilidade inicial pode estar relacionada à associação temporária da Nys à cavidade hidrofóbica da β CD, que retarda sua liberação em comparação à forma livre, imediatamente disponível (Stella *et al.*, 1999; Hirayama; Uekama, 1999). Padrão semelhante foi relatado por Garcia *et al.* (2025), que observaram halos numericamente maiores para a Nys livre em comparação à Nys: β CD, sem diferença estatística entre as formulações. Entretanto, os autores utilizaram a cepa *C. albicans* SC5314 e o protocolo EUCAST, enquanto o presente estudo empregou a cepa padronizada ATCC 90028 e o protocolo CLSI, limitando comparações diretas entre os resultados. Ressalta-se que os *modelos in vitro* não reproduzem integralmente a cavidade oral, onde *C. albicans* ocorre predominantemente em biofilmes, mais resistentes aos antimicrobianos que as formas planctônicas (Ramage *et al.*, 2001).

Nesse contexto, avaliou-se a atividade metabólica de biofilmes de *C. albicans*, a fim de determinar a eficácia antifúngica dos cremes adesivos sobre células organizadas nessa condição, mais representativa do ambiente oral. Os biofilmes foram formados em placas de microtitulação, modelo amplamente utilizado para quantificar sua viabilidade frente a diferentes tratamentos (Ramage *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2015). Como parâmetro comercial, optou-se por utilizar a suspensão oral de nistatina (NysOS; 100.000 U.I.) como grupo controle positivo, igualando a proporção de Nys presente em cada tratamento. Esse modelo permitiu avaliar a atividade antifúngica dos cremes adesivos pelo ensaio de XTT, que demonstrou elevada redução da atividade metabólica do biofilme tanto em 3 como em 6 h de tratamento com DACNys e DACNys: β CD, indicando ação antifúngica rápida e sustentada. A NysOS, por sua vez, apresentou efeito intermediário sobre a atividade

metabólica do biofilme, achado consistente com seu desempenho frente às células planctônicas. DACNys e DACNys: β CD inibiram completamente o crescimento de células planctônicas viáveis de *C. albicans*, evidenciado pela ausência de crescimento nas contagens de UFC/mL, a NysOS não eliminou totalmente essa população. Entretanto, este estudo apresenta limitações inerentes aos modelos experimentais utilizados.

Como a EP está intimamente relacionada à formação de biofilmes sobre biomateriais, modelos desenvolvidos em materiais clinicamente relevantes são considerados mais representativos da condição clínica. Nesse contexto, foi realizado outro ensaio de atividade antifúngica em biofilme de *C. albicans* formado sobre a superfície de espécimes de resina acrílica termopolimerizável utilizada em base de prova de próteses. Com o intuito de avaliar a redução da atividade metabólica dos biofilmes, os espécimes foram submetidos ao ensaio de redução do XTT, complementado pela caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados demonstraram maior redução da atividade metabólica nos biofilmes tratados com os cremes adesivos Nys, DACNys e DACNys: β CD, seguidos pelo adesivo comercial UCC e, por fim, pelo grupo controle sem fármaco (DAC). Esse comportamento reforça a associação entre a presença de Nys nas formulações e a atividade antifúngica observada.

As alterações morfológicas observadas por MEV evidenciaram alterações estruturais nas células fúngicas nos grupos contendo Nys. A presença de blastoconídios colapsados, deformações celulares e desorganização das estruturas filamentosas é compatível com o mecanismo de ação da Nys, que interage com o ergosterol presente na membrana celular fúngica, promovendo alterações na sua permeabilidade e integridade (Sousa *et al.*, 2023). Além disso, o comprometimento das estruturas filamentosas pode estar relacionado à alteração da organização do biofilme de *C. albicans*, considerando que as hifas desempenham importante papel na arquitetura tridimensional do biofilme, contribuindo para sua organização e para a interação com a matriz extracelular (Chandra *et al.*, 2001b). Nesse contexto, as alterações morfológicas observadas por MEV podem representar não apenas danos celulares decorrentes da ação da Nys, mas também alterações na organização estrutural do biofilme. A observação desses efeitos nos dois cremes adesivos contendo Nys sugere que a incorporação do antifúngico à formulação, tanto na forma livre quanto complexada à β -ciclodextrina, preservou sua atividade antifúngica frente

ao biofilme de *C. albicans*. A análise complementar por microscopia confocal de varredura a laser poderá fornecer informações adicionais sobre a viabilidade e a organização espacial das células no biofilme, contribuindo para a confirmação e melhor caracterização dos efeitos observados por XTT e MEV. Clinicamente, o desenvolvimento de um creme adesivo protético com propriedades antifúngicas poderá contribuir para melhorar a adesão dos pacientes ao tratamento, especialmente entre indivíduos que apresentam dificuldades na utilização de terapias antifúngicas convencionais, como os bochechos com suspensão oral de Nys.

Além da atividade antifúngica, avaliou-se a biocompatibilidade dos cremes adesivos. A viabilidade celular apresentou comportamento dependente da diluição, com valores superiores a 70% nas maiores diluições avaliadas, indicando ausência de citotoxicidade nessas condições, conforme os critérios da ISO 10993-5 (ISO, 2009). Nas menores diluições, o DACNys apresentou maior redução da viabilidade celular em comparação ao DACNys: β CD, sugerindo menor citotoxicidade após a complexação da Nys com β CD. Esse efeito pode estar relacionado à modulação da disponibilidade da Nys livre pela β CD (Moraes et al., 2024). Entretanto, Moraes et al. (2024) e Sugio et al. (2026), ao avaliarem Nys e Nys: β CD isoladamente, não observaram diferenças significativas entre as formas, indicando que a interação com a matriz do creme adesivo pode ter contribuído para o comportamento observado no presente estudo. Em contraste, UCC e NysOS mantiveram viabilidade $\geq 70\%$ em diluições menores, sugerindo menor potencial citotóxico nas condições avaliadas. Embora diferenças estatísticas em relação ao controle negativo tenham sido observadas em algumas condições, somente viabilidades inferiores a 70% são classificadas como citotóxicas pela ISO 10993-5 (ISO, 2009). Entretanto, os resultados devem ser interpretados dentro das limitações inerentes aos modelos in vitro. A avaliação foi realizada em uma única linhagem celular e em condições experimentais controladas, que não reproduzem integralmente a complexidade biológica da mucosa oral. Dessa forma, estudos adicionais utilizando modelos mais complexos, incluindo culturas tridimensionais, modelos de mucosa oral e ensaios in vivo, são necessários para confirmar a biocompatibilidade observada e o potencial clínico da formulação.

Os resultados de remoção dos cremes adesivos podem ser comparados aos dados disponíveis na literatura. Costa et al. (2022) observaram maior eficiência para a escovação com sabonete neutro e dentifrício, enquanto a imersão isolada em Corega

Tabs® apresentou menor eficiência. Esses achados são consistentes com o presente estudo, no qual os menores percentuais de material remanescente foram observados após a escovação com sabonete neutro e após a associação entre Corega Tabs® e escovação, enquanto a imersão isolada resultou em maior quantidade de adesivo residual. A eficiência da remoção, entretanto, depende da interação entre o adesivo, o substrato e o método de higienização. Polychronakis et al. (2021) demonstraram que o tipo de adesivo, o material da base protética e o método empregado influenciam a quantidade de material remanescente. Nesse contexto, a menor eficiência da imersão isolada em Corega Tabs® pode estar relacionada à ausência de ação mecânica, uma vez que a associação entre agentes químicos e escovação pode favorecer o desprendimento do material residual. Resultados de Nunes et al. (2016) também reforçam a influência do protocolo de higienização na remoção dos adesivos.

A maior quantidade de adesivo remanescente observada após a escovação com dentífrício, em comparação aos resultados descritos por Costa et al. (2022), deve ser interpretada considerando as possíveis diferenças entre os produtos empregados nos dois estudos. Embora Costa *et al.* (2022) tenham informado a utilização de um dentífrício da marca Colgate®, a formulação específica e a composição do produto não foram descritas. Dessa forma, não é possível estabelecer uma comparação direta quanto às características físico-químicas e ao potencial abrasivo dos dentífrícios utilizados. Essas diferenças podem ter influenciado a capacidade de remoção do adesivo durante a escovação e, conseqüentemente, a quantidade de material remanescente observada. Assim, essa divergência não deve ser atribuída exclusivamente ao método de escovação. Em relação à escovação com água, o presente estudo empregou água morna, enquanto Costa et al. (2022) utilizaram água destilada. Apesar dessa diferença, o UCC apresentou maior quantidade de material remanescente após esse protocolo, sugerindo que a temperatura da água, isoladamente, apresenta efeito limitado sobre a remoção do adesivo.

De modo geral, os cremes experimentais apresentaram quantidade de material remanescente igual ou inferior à do UCC na maioria dos protocolos avaliados, indicando que a incorporação da Nys, livre ou complexada à β CD, não comprometeu a removibilidade das formulações. Esse resultado é relevante para a aplicação clínica, uma vez que a remoção adequada dos adesivos protéticos integra os cuidados de higiene das próteses. Essa questão merece atenção especial em pacientes idosos, que constituem uma parcela importante dos usuários de próteses dentárias e podem

apresentar limitações motoras que dificultam a realização de procedimentos de higiene oral e protética. Nesse contexto, formulações que conciliem atividade antifúngica e possibilidade de remoção por métodos convencionais de higiene podem representar uma vantagem prática.

Os achados do estudo se mostram relevantes quando analisados em conjunto. O DACNys:βCD apresentou menor citotoxicidade, sua atividade antifúngica foi mantida, além de apresentar maior estabilidade e fotoproteção quando comparada à formulação contendo Nys livre. Em conjunto, os resultados demonstram que o DACNys:βCD, contendo a Nys complexada com βCD, permitiu otimizar o equilíbrio entre eficácia antifúngica e biocompatibilidade do creme adesivo experimental *in vitro*. Adicionalmente, caso a eficácia e segurança sejam confirmadas em estudos clínicos, a associação entre a ação antifúngica, a redução do biofilme e a função adesiva poderá contribuir para o controle da infecção, reduzir a necessidade de intervenções adicionais e, potencialmente, diminuir o número de consultas e a duração do tratamento, embora esses desfechos ainda precisem ser investigados.

A melhora da estabilidade e da retenção da prótese também poderá favorecer o conforto, a segurança e a confiança dos usuários, com possíveis repercussões positivas na autoestima e na qualidade de vida. Portanto, o DACNys:βCD apresenta potencial para uma futura aplicação clínica, cuja viabilidade dependerá da confirmação de sua eficácia, segurança e benefícios clínicos em estudos *in vivo* e ensaios clínicos.

7 CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico por UV-Vis apresentou desempenho adequado para a quantificação da nistatina (Nys), atendendo aos critérios de validação estabelecidos pela RDC nº 166/2017. Ambos os cremes, DACNys e DACNys:βCD, apresentaram liberação de Nys ao longo de 480 min, sendo a liberação cumulativa maior para a formulação complexada. A DACNys:βCD também apresentou maior fotoestabilidade, mantendo maior teor residual de Nys após exposição à radiação UV-C. Entretanto, após 72 h de exposição, ambas as formulações apresentaram aumento da espalhabilidade e formação de grumos, indicando alterações físicas nessas condições. O pH permaneceu estável durante o período avaliado.

A incorporação de Nys aos cremes adesivos preservou a atividade antifúngica frente a *Candida albicans*, com redução da atividade metabólica dos biofilmes e alterações morfológicas compatíveis com a ação do fármaco. Embora ambas as formulações tenham promovido redução do biofilme, a complexação com β-ciclodextrina não demonstrou superioridade em relação à Nys livre quanto à inibição do biofilme. Em relação à citotoxicidade, a viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 manteve-se acima de 70% nas diluições avaliadas, a partir de 1/640 para a DACNys:βCD e de 1/1280 para a DACNys, evidenciando melhor perfil de biocompatibilidade da formulação complexada nas condições mais concentradas. A incorporação de Nys não comprometeu a removibilidade dos cremes; entretanto, a imersão isolada em pastilhas efervescentes Corega Tabs® não promoveu remoção efetiva, mantendo 100% do material remanescente nas condições avaliadas, enquanto a escovação favoreceu a remoção.

Em conjunto, os resultados demonstram que a complexação com β-ciclodextrina favoreceu a liberação e a fotoestabilidade da Nys, mas não proporcionou maior atividade antibiofilme em comparação à Nys livre. Ambas as formulações apresentaram potencial para o desenvolvimento de cremes adesivos protéticos com atividade antifúngica e antibiofilme contra *C. albicans*. Estudos adicionais, incluindo avaliações in vivo e clínicas, são necessários para estabelecer a segurança, a eficácia e a aplicabilidade clínica dessa abordagem no tratamento da estomatite protética.

REFERÊNCIAS

- AFRAMIAN, D.; DAVIDOWITZ, T.; BENOLIEL, R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Diseases*, v. 12, n. 4, p. 420-423, 2006.
- AL-BARGHOUTHY, E. Y. *et al.* Comparative evaluation of spreadability measurement methods for topical semisolid formulations: a scoping review. *Gels*, v. 11, n. 12, art. 1006, 2025.
- ALMEIDA, N. L. M. *et al.* Antimicrobial activity of denture adhesive associated with *Equisetum giganteum*- and *Punica granatum*-enriched fractions against *Candida albicans* biofilms on acrylic resin surfaces. *Biofouling*, v. 34, n. 1, p. 62-73, 2018.
- ALMOYAD, M. A. Comparative efficacy of drug interventions in denture-associated oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *King Khalid University Journal of Health Sciences*, v. 10, n. 2, p. 121-132, jul./dez. 2025.
- ALVIM, G. C. *et al.* Evaluation of the antifungal effect and adhesive strength of a denture adhesive supplemented with nystatin. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, v. 9, n. 1, e4337, 2024.
- AMANLOU, M. *et al.* Miconazole gel compared with *Zataria multiflora* Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis. *Phytotherapy Research*, v. 20, n. 11, p. 966-969, 2006.
- ANSOLIN, T. L. *et al.* The effect of β -cyclodextrin in the photochemical stability of propranolol hydrochloride in aqueous solution. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 36, n. 2, p. 337-340, 2014.
- BAJUNAID, S. O. *et al.* Denture acrylic resin material with antibacterial and protein-repelling properties for the prevention of denture stomatitis. *Polymers*, v. 14, n. 2, art. 230, 2022.
- BASSI, R. C.; BORIOLLO, M. F. G. Amphotericin B, fluconazole, and nystatin as development inhibitors of *Candida albicans* biofilms on a dental prosthesis relined material: analytical models *in vitro*. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 127, n. 2, p. 320-330, 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopeia Brasileira*. 6. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2019a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia para tratamento estatístico da validação analítica*: guia nº 10, de 30 de agosto de 2017. Brasília, DF: ANVISA, 2017a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2017b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Dispõe sobre estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2019b.

BRESCANSIN, E. G. *et al.* Physical and chemical analysis of commercial nystatin. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, Maringá, v. 35, n. 2, p. 215-221, 2013.

BUENO, M. G. *et al.* Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Diseases*, v. 21, n. 1, p. 57-65, 2015.

CAPISTRANO, H. M. *et al.* Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, art. 947980, 2013.

CARTAGENA, A. F. *et al.* New denture adhesive containing miconazole nitrate polymeric microparticles: antifungal, adhesive force and toxicity properties. *Dental Materials*, v. 33, n. 2, p. e53-e61, 2017.

CHANDRA, J. *et al.* Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research*, v. 80, n. 3, p. 903-908, 2001a.

CHANDRA, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001b.

CIRRI, M. *et al.* Development of a hydroxypropyl- β -cyclodextrin-based liquid formulation for the oral administration of propranolol in pediatric therapy. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 9, art. 2217, 2023.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline. Wayne, PA: CLSI, 2004. (CLSI document M44-A).

COELHO, C. C. *et al.* Nano-hydroxyapatite in oral care cosmetics: characterization and cytotoxicity assessment. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, art. 11050, 2019.

COSTA, M. S. *et al.* Effects of different forms of denture adhesives on biofilm formation, adhesive strength and hygiene of complete dentures. *The International Journal of Prosthodontics*, v. 35, n. 6, p. 784-792, 2022.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

FALAH-TAFTI, A. *et al.* A comparison of the efficacy of nystatin and fluconazole incorporated into tissue conditioner on the *in vitro* attachment and colonization of *Candida albicans*. *Dental Research Journal*, v. 7, n. 1, p. 18-22, 2010.

FIGUERÔA, R. M. S. *et al.* Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave. *Journal of Applied Oral Science*, v. 26, e20170383, 2018.

GALINDRES-JIMÉNEZ, D. M. *et al.* Antibiotic–cyclodextrin interactions: an effective strategy for the encapsulation of environmental contaminants. *Molecules*, v. 30, n. 22, art. 4359, 2025.

GARAICOA, J. L. *et al.* Promise of combining antifungal agents in denture adhesives to fight *Candida* species infections. *Journal of Prosthodontics*, v. 27, n. 8, p. 755-762, 2018.

GARCIA, A. A. M. N. *et al.* Nystatin:β-cyclodextrin and chlorhexidine:β-cyclodextrin mucoadhesive hydrogels for site-specific buccal applications. *Therapeutic Delivery*, v. 16, n. 4, p. 327-338, 2025.

GARG, A. *et al.* Spreading of semisolid formulations: an update. *Pharmaceutical Technology*, v. 26, n. 9, p. 84-105, 2002.

HAN, J. M. *et al.* The adhesive strength and initial viscosity of denture adhesives. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 72, n. 8, p. 839-845, 2014.

HEMMATEENEJAD, B. *et al.* Photodegradation study of nystatin by UV-Vis spectrophotometry and chemometrics modeling. *Journal of AOAC International*, v. 97, n. 4, p. 1206-1212, 2014.

HILGERT, J. B. *et al.* Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 64, n. 12, p. 2539-2545, 2016.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, n. 1, p. 125-141, 1999.

ILBAY, S. G.; GÜVENER, S.; ALKUMRU, H. N. Processing dentures using a microwave technique. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 21, p. 103-109, 1994.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). ICH Q1B: photostability testing of new drug substances and products. Geneva: ICH, 1996.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). ICH Q2(R1): validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva: ICH, 2005.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). ICH Q2(R2): validation of analytical procedures. Geneva: ICH, 2023.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 1567: dentistry: denture base polymers. Geneva: ISO, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices: part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: ISO, 2009.

IOELE, G. *et al.* Photosensitive drugs: a review on their photoprotection by liposomes and cyclodextrins. *Drug Delivery*, v. 24, supl. 1, p. 33-44, 2017.

IQBAL, Z. *et al.* Effectiveness of nystatin incorporated in tissue conditioners in the treatment of denture-induced stomatitis. *Biomedica*, v. 31, n. 4, p. 303-309, 2015.

IYER, M. S. *et al.* Development and evaluation of clove and cinnamon supercritical fluid extracts-loaded emulgel for antifungal activity in denture stomatitis. *Gels*, v. 8, n. 1, art. 33, 2022.

LARDY, F. *et al.* Functionalization of hydrocolloids: principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, n. 7, p. 715-721, 2000.

ŁASICA, P. A. *et al.* Biocompatibility of denture adhesives: effects on oral tissues and inflammatory responses, literature review. *Dentistry Journal*, v. 13, n. 11, art. 535, 2025.

LAZARIN, A. A. *et al.* *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology*, v. 31, n. 1, p. 25-33, 2014.

LI, Z. *et al.* Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology*, v. 33, n. 2, p. 209-216, 2016.

LOMBARDI, A.; OUANOUNOU, A. Fungal infections in dentistry: clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 130, n. 5, p. 533-546, 2020.

LOMBARDI, T.; BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*, v. 2, n. 1, p. 17-22, 1993.

MAMATHA, K.; SRINIVASARAO, P. V. A review on mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of Innovations in Applied Pharmaceutical Science*, v. 7, n. 1, p. 32-36, 2022.

MARTINS, K. V.; GONTIJO, S. M. L. Treatment of denture stomatitis: literature review. *Revista de Odontologia Brasileira Central*, Goiânia, v. 74, n. 3, p. 215-220, 2017.

MENEGHETTI, C. W. *Creme adesivo experimental para próteses removíveis incorporado com nistatina: β -ciclodextrina: avaliação físico-química, mecânica e biológica*. Orientadora: Nara Hellen Campanha Bombarda. 2024. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2024a.

MENEGHETTI, C. W. *et al.* *Creme mucoadesivo com nistatina: β -ciclodextrina para tratamento de estomatite protética*. Depositante: Universidade Estadual de Ponta Grossa. BR 10 2024 016312-5. Depósito: 9 ago. 2024b.

MENEGHETTI, C. W. *et al.* Creme mucoadesivo com nistatina para tratamento de estomatite protética. Depositante: Universidade Estadual de Ponta Grossa. BR 10 2024 016316-8. Depósito: 9 ago. 2024c.

MENEGHETTI, C. W. *et al.* Creme fixador de próteses removíveis para paciente com hipossalivação. Depositante: Universidade Estadual de Ponta Grossa. BR 10 2024 016323-0. Depósito: 9 ago. 2024d.

MORAES, G. S. *et al.* A novel acrylic resin palatal device contaminated with *Candida albicans* biofilm for denture stomatitis induction in Wistar rats. *Journal of Applied Oral Science*, v. 29, e20200865, 2021.

MORAES, G. S. *et al.* Anti-*Candida* activity and *in vitro* toxicity screening of antifungals complexed with β -cyclodextrin. *Journal of Applied Toxicology*, v. 44, n. 5, p. 747-755, 2024.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUSTAFA, M. H. *et al.* Development and evaluation of nystatin-loaded novasomal gel for the treatment of *Candida albicans* infection: *in vitro* microbiological and skin compatibility study. *Gels*, v. 11, n. 10, art. 774, 2025.

NUNES, E. M. *et al.* Crossover clinical trial of different methods of removing a denture adhesive and the influence on the oral microbiota. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 115, n. 4, p. 462-468, 2016.

OLIVEIRA, S. G. D. *et al.* Retentive efficacy, antimicrobial and cytotoxicity comparisons between different types of commercial and experimental denture adhesives with antifungal action. *Dental Materials Journal*, v. 40, n. 4, p. 1055-1062, 2021.

PACHAVA, K. R. *et al.* Invitro antifungal evaluation of denture soft liner incorporated with tea tree oil: a new therapeutic approach towards denture stomatitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 6, p. ZC62-ZC64, 2015.

PERALTA, L. C. F. *et al.* Silver nanoparticles in denture adhesive: an antimicrobial approach against *Candida albicans*. *Journal of Dentistry*, v. 131, art. 104445, 2023.

PERIĆ, M. *et al.* A systematic review of denture stomatitis: predisposing factors, clinical features, etiology, and global *Candida* spp. distribution. *Journal of Fungi*, v. 10, n. 5, art. 328, 2024.

POLYCHRONAKIS, N. *et al.* Removal of denture adhesives from PMMA and polyamide denture base materials. *Journal of Applied Oral Science*, v. 29, e20200448, 2021.

RAI, A. *et al.* Nystatin effectiveness in oral candidiasis treatment: a systematic review & meta-analysis of clinical trials. *Life*, Basel, v. 12, n. 11, art. 1677, 2022.

RAMAGE, G. *et al.* Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, 2001.

RAMAKRISHNAN, A. N. *et al.* Multi-parameter viscoelastic material model for denture adhesives based on time-temperature superposition and multiple linear regression analysis. *BMC Biomedical Engineering*, v. 6, art. 8, 2024.

ROSA, W. L. O. da *et al.* Current trends and future perspectives in the development of denture adhesives: an overview based on technological monitoring process and systematic review. *Journal of Biomedical Sciences*, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2015.

SCHOEFFEL, A. C. *et al.* Knoop microhardness of conventional and microwaved denture base acrylic resins. *Indian Journal of Dental Research*, v. 30, n. 6, p. 927-932, 2019.

SILVA, M. J. *et al.* Effect of denture-coating composite on *Candida albicans* biofilm and surface degradation after disinfection protocol. *International Dental Journal*, v. 66, n. 2, p. 86-92, 2016.

SIMÕES, A.; VEIGA, F.; VITORINO, C. Progressing towards the sustainable development of cream formulations. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 7, art. 647, 2020.

SOMER, A. *et al.* Nystatin complexation with β -cyclodextrin: spectroscopic evaluation of inclusion by FT-Raman, photoacoustic spectroscopy, and ^1H NMR. *Materials Chemistry and Physics*, v. 239, art. 122117, 2020.

SOUSA, F. *et al.* Reviving the interest in the versatile drug nystatin: a multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 199, art. 114969, 2023.

SPARTALIS, G. K. *et al.* Effect of conventional water-bath and experimental microwave polymerization cycles on the flexural properties of denture base acrylic resins. *Dental Materials Journal*, v. 34, n. 5, p. 623-628, 2015.

STELLA, V. J. *et al.* Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, n. 1, p. 3-16, 1999.

SUGIO, C. Y. C. *et al.* Characterization, antifungal potential, cytocompatibility, and regenerative potential of mucoadhesive gel containing antifungal- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Prosthodontics*, v. 35, n. 6, p. 898-909, 2026.

TAY, L. Y. *et al.* Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 118, n. 1, p. 72-77, 2014.

TØNNESEN, H. H. Photostability of drugs and drug formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 225, n. 1-2, p. 1-14, 2004.

URBAN, A. M. *et al.* Characterization, antifungal evaluation against *Candida* spp. strains and application of nystatin: β -cyclodextrin inclusion complexes. *Current Drug Delivery*, v. 20, n. 10, p. 1533-1546, 2023.

URBAN, V. M. *et al.* Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. *Journal of Prosthodontics*, v. 15, n. 5, p. 295-299, 2006.

YÜCESOY, M.; ŞENTÜRKER GÜLDAŞ, N.; YULUG, N. Disk diffusion method for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* strains. *Journal of Chemotherapy*, v. 13, n. 2, p. 161-166, 2001.

ZHANG, Y. *et al.* DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 3, p. 263-271, 2010.