

## SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ANTI- ENZIMÁTICA E POTENCIAL CITOTÓXICO DO COMPOSTO 2 FENIL- 4H- CROMEN- 4- ONA

**MACHADO, Fernanda Weingartner<sup>1</sup>;**  
**PIVA, Evandro**<sup>2</sup>  
**RECH, Maquelis Tavares**<sup>3</sup>  
**OLIVEIRA, Simone Gomes Dias**<sup>4</sup>  
**LUND, Rafael Guerra**<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Graduação em Odontologia (FOP-UFPEL) e Bolsista PROBIC-FAPERGS;- [fe552000@yahoo.com.br](mailto:fe552000@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Orientador do trabalho e professor do Departamento de Odontologia Restauradora (FOP/UFPEL) – [evpiva@gmail.com](mailto:evpiva@gmail.com)

<sup>3</sup> Aluna de Graduação em Odontologia (FOP-UFPEL) e Bolsista PIBIC-FAPERGS;- [maquelis.rech@hotmail.com](mailto:maquelis.rech@hotmail.com)

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós Graduação em Odontologia (FOP-UFPEL) e Bolsista PIBIC-CNPq;- [sisi\\_mone@hotmail.com](mailto:sisi_mone@hotmail.com)

<sup>5</sup> Professor do Departamento de Odontologia Restauradora (FOP/UFPEL);- [rafael.lund@gmail.com](mailto:rafael.lund@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por leveduras são muito comuns em pacientes portadores de próteses totais. Uma dessas infecções denomina-se estomatite protética e o seu tratamento depende do grau de comprometimento do paciente, substituição de próteses antigas e em alguns casos o uso de drogas antifúngicas tópicas e ou sistêmicas (DIXON, 1999). No entanto, nem sempre a motivação do paciente e a troca de próteses são suficientes para a remissão dos sinais e sintomas. Além disso, alguns fatores predispõem à doença como indivíduos imunodeprimidos, portadores do vírus HIV e pacientes em tratamento para câncer.

Existem varias vertentes sobre a etiologia dessa patologia, sabendo-se atualmente que esta se deriva de forma multifatorial. Embora a *C. albicans* ainda seja apontada como o potencial causador dessa patologia, há uma demanda maior desse tipo de infecção pelo gênero “não-albicans” ao longo dos últimos 15 anos.( NGUYEN, et. al. 1996; TORTORANO et. al. 2004).

Ademais, a crescente resistência dos fungos vem sendo uma preocupação recorrente na clinica odontológica. Por esse motivo, torna-se imprescindível cada vez mais a busca de fármacos antifúngicos eficientes para o tratamento da doença.

Vários compostos derivados de produtos naturais vêm demonstrando-se como potenciais agentes antifúngicos podendo servir como alternativa para esses casos de resistência. As flavonas, uma classe de flavonóides, são compostos polifenólicos com ações em doenças coronarianas (REIN et. al. 2000), diabetes (LAPIDOT et. al. 2002), antioxidantes, doenças cerebrais, entre outros. Suas principais fontes incluem frutos (uvas, cerejas maçã, frutas cítricas, entre outras) e hortaliças (brócolis, pimenta, tomate cebola, entre outras) (BARNES et. al. 2001). Frente a esses efeitos positivos já comprovados cientificamente, este estudo objetivou avaliar o efeito antifúngico, antienzimático e citotóxico da 2-fenil-4H-cromen-4-ona.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

### 2.1 Susceptibilidade Antifúngica (Teste de Microdiluição em Caldo)

Para a realização deste teste foram coletadas cepas de pacientes atendidos no Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca (CDDDB), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FOP-UFPEL). Estas cepas foram: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *Rhodotorula mucillaginosa*. Os espécimes foram semeados em Sabouraud Dextrose Agar com 0,2 mg/mL de cloranfenicol e incubados a 37°C por 24 - 48h. As cepas selecionadas foram cultivadas 24h antes do teste a fim de se preparar o inóculo.

Na preparação do inóculo uma alíquota de cada cepa foi suspensa em tubos de ensaio com uma solução salina (5 mL), e ajustada de acordo com teste de distorção e turbidez na escala 0,5 de MacFarland. Após homogeneização, 0,05 mL da suspensão foi adicionada a 4,95 mL de solução salina, e desta 0,25 mL foram adicionados e homogeneizados a 9,75 mL de RPMI.

O produto foi dissolvido para o teste em álcool etílico 70%. O composto foi previamente pesado e dissolvido em 500 µg mL<sup>-1</sup> do solvente proposto. A partir da solução-mãe (500 µg/ml) foram preparadas diluições resultando em concentrações seriadas para todos os compostos. As concentrações do produto testado teve uma variação de concentração de 0,49 a 250 µg/ml.

O antifungigrama com os compostos foi realizado através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC) de acordo com o documento de referência M27A3 (CLSI, 2008). Para isso, foram utilizadas placas plásticas estéreis (Nuclon ®1) com 96 micro-poços de fundo chato, constituídas por doze colunas, e oito séries identificadas de A à H. Em cada micro-poço foram pipetados 100 µL do produto e 100 µL do inóculo. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 37°C, e a leitura realizada em 24 e 48h. Na mesma placa houve a utilização de controles positivos e negativos. Para leitura do teste, foi realizada comparação visual do crescimento da levedura ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poços de 1 a 10) com o seu crescimento no poço-controle positivo. A menor concentração capaz de produzir inibição (50%) do crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo foi identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima).

### 2.2 Atividade Anti-enzimática

Para este teste, foram utilizadas as mesmas cepas. Inicialmente os meios fosfolipase e proteinase foram preparados e vertidos em Placas de Petry

O inóculo foi preparado colocando-se uma alíquota de cepa em um tubo de ensaio com 5 mL de PBS, ajustando com teste de distorção e turbidez 0,5 na escala de MacFarland.

Para o preparo do produto foram misturados 20 µL do produto e 1980 µL de PBS. Então, 0,5 mL do inóculo foi colocado no produto e incubado por 30 min em uma estufa a 37°C. Após retirada da estufa, o composto inóculo/produto foi colocado em uma centrífuga por 15 min a 300 RPM. Em seguida feita a lavagem com PBS 1% esterilizado (retira-se 200 µL de cada tubo, e acrescenta-se 200 µL do PBS), posteriormente este processo foi repetido. Após isso, os tubos foram agitados em um vórtex e pipetados 20 µL da suspensão inóculo/produto nas placas de Petry com os meios preparados. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C para realização da leitura. A leitura para o teste de atividade anti-enzimática foi realizada em 72h para o meio proteinase e 96h para o meio fosfolipase, medindo-se

o diâmetro do halo, e o diâmetro da colônia. Então foi realizada a razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro total (colônia + halo) para calcular o Pz (Atividade Anti-enzimática).

### 2.3 Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, foram utilizados fibroblastos de rato (3T3/NIH) (Banco de Células do Rio e Janeiro, RJ, Brasil) e os produtos testados foram preparados nas mesmas concentrações que o teste de microdiluição, porém a diluição das flavonas foram feitas em DMEM. A suspensão das células foi plaqueada em uma concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço e distribuídas em uma placa de cultura celular (ELISA) de 96 poços com 200  $\mu\text{L}$  de DMEM em cada cavidade. A placa então foi incubada a  $37^\circ\text{C}$ , em ambiente de 5%  $\text{CO}_2$ , por 24 h. Após este período o meio de cultura foi removido dos poços e volumes iguais (200  $\mu\text{L}$ ) dos compostos já diluídos foram adicionados em cada poço. Nos poços controles, 200  $\mu\text{L}$  de DMEM foram adicionados. Após a remoção dos extratos testes, 200  $\mu\text{L}$  de PBS e 20  $\mu\text{L}$  de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo] foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada sem luminosidade por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Então o MTT foi aspirado e 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço. Subsequentemente, a absorbância a 570 nm foi medida usando um espectrofotômetro e os resultados analisados estatisticamente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram respectivamente: CIM > 62,5  $\mu\text{g/ml}$  e CFM > 250  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans*; CIM = 0,48  $\mu\text{g/ml}$  para *R. mucillaginosa*; CIM/CFM = 31,25  $\mu\text{g/ml}$  para *C. parapsilosis*; CIM/CFM = 62,5  $\mu\text{g/ml}$  para *C. famata*; CIM/CFM = 125  $\mu\text{g/ml}$  para *C. glabrata* e CIM = 15,62  $\mu\text{g/ml}$  para *C. lipolytica*.

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada de acordo com o protocolo NCCLS M27-A, atualizada em 2002 (M27-A2).

Para avaliação da atividade anti-enzimática os valores de Pz para fosfolipase e proteinase ( $p=0,50$ ) antes e após exposição das leveduras ao composto não tiveram diferenças estatísticas ( $p=0,86$  e  $p=0,50$ , respectivamente).

Como resultado para o teste de citotoxicidade, esse produto mostrou uma baixa toxicidade contra fibroblastos 3T3/NIH na concentração da flavona testada. Para melhor interpretação dos resultados, esses dados foram analisados estatisticamente e os poços que continham o produto foram comparados entre eles e com o controle. Quando comparados pelo teste estatístico One Way ANOVA, a fim de compararmos as concentrações dos compostos entre si, não houve diferença estatística ( $P < 0,001$ ). A fim de compararmos a ação dos compostos sobre as células e o controle onde apenas tínhamos as células em seu meio respectivo, utilizou-se o teste estatístico de Dun's. Como resultados, observou-se que não houve diferença significativa nos poços em que houve a adição do composto e aqueles onde não houve essa adição.

## 4 CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas, concluiu-se que a 2-fenil-4H-cromen-4-ona é um agente antifúngico promissor, nas concentrações testadas, apenas como fungicida e apresenta baixa citotoxicidade.

## 5 REFERÊNCIAS

BARNES, J; Anderson, LA; Phillipson, JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **J Pharm Pharmacol**; 53(5):583-600,2001.

DIXON, DL et al. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. **J Prosthet Dent.**; 81:207-14,1999.

LAPIDOT, T; WALKER, MD. J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic -cells in vitro. **J Agric Food Chem** ; 50(25):7220-5,2002.

.NGUYEN, MH; PEACOCK, JE; MORRIS, AJ et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am J Med** ; 100:617–23,1996.

REIN, D ;PAGLIERONI, TG; PEARSON, DA; WUN, T; SCMITZ, HH; GOSSELIN, R; KEEN, CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. **J Nutr** ;130(8Suppl):2120S-6S,2000.

TORTORANO AM; PAMAN, J; BERNHARDT, H et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospitalbasedsurveillance study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** ; 23: 317–22,2004.