

INIBIÇÃO *in vitro* DA PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS DE *Candida albicans* POR UM SAL DERIVADO DE HIDRAZONA

CARVALHO, Pedro Henrique de Azambuja¹; DUVAL, Auri Rocha²; CUNICO, Wilson³; LUND, Rafael Guerra⁴

¹Faculdade de Odontologia UFPel – Acadêmico de Graduação - bolsista PROBITE FAPERGS;

²Instituto de Química e Geociências UFPel – Acadêmico de Doutorado no PPGQ; ³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos; ⁴Laboratório de Microbiologia Oral, Faculdade de Odontologia UFPel..

pedro_henrique_91_3@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

As infecções humanas por *Candida spp* endógena (da microbiota normal) estão relacionadas a fatores determinantes, que afetem a microbiota normal, o sistema imune do hospedeiro ou exacerbe a virulências, podendo ser inclusive fisiológicos como a gravidez e suas alterações hormonais ou a idade avançada, entretanto freqüentemente está associada a deficiências imunes patológicas como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (NEVILLE et. al, 2004).

A resistência microbiana tem impulsionado à pesquisa por novos fármacos e maneiras de coibir infecções microbianas. O controle dos fatores de virulência microbianos surge como opção para evitar o desenvolvimento da resistência, dentre os fatores de virulência da *C. albicans* observa-se a produção de exoenzimas fosfolipases e proteinases.

As proteinases são enzimas hidrolíticas capazes de degradar substratos como albumina, imunoglobulinas e proteínas da derme como o colágeno, já a fosfolipase exerce papel na destruição da membrana da célula alvo pela hidrólise dos fosfolipídeos, podendo ser considerada um dos fatores de virulência mais importantes, pois permite a aderência ao tecido lesado e facilita a invasão da célula, sendo que cepas do gênero *Candida* com menores atividades enzimáticas são potencialmente menos virulentas. (KADIR et al, 2007; LYON et al, 2006; PINTO et al, 2008; WILLIS et al, 2001)

As hidrazonas são uma família de substâncias químicas bioativas derivados de aldeídos ou cetonas, sendo estes precursores encontrados em diversas plantas, como podemos citar o exemplo da *Cassia spectabilis* ("cássia") e *Tabebuia avellanedae* ("Ipê Roxo") de intercorrência frequente na literatura química e médica (VIEGAS Jr. et al., 2009; FERREIRA et al., 2010).As hidrazonas, apresentaram recentemente a identificação de efeito fungicida em estudo realizado com metodologias de Concentração Inibitória Mínima (DUVAL et al., 2011), abrindo um leque de novas oportunidades de pesquisa dentro desta família de substâncias .

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a redução da produção de Fosfolipase e Proteinase de dez isolados de *C. albicans* quando expostos a uma hidrazona (4-(2-fluorfenilhidrazona)-7-cloroquinolina).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para determinação do efeito inibitório da 4-(2-fluorfenilhidrazona)-7-cloroquinolina (Agente Inibitório – AI) sobre a produção de exoenzimas dos isolados de *C. albicans* foi adotada a metodologia proposta por Kadir et al. (2007).

Inicialmente foram reativadas amostras cedidas pelo laboratório de microbiologia oral 24h antes do ensaio, incubada em estufa a 37°C em placas de petri contendo ágar Sabouraud Dextrose e Cloranfenicol a 0,1%.

Após a reativação as amostras foram diluídas em tampão fosfato salino a 1% (PBS) de acordo com o valor de 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, para posteriormente serem expostas a uma solução do AI) em concentrações variadas, de 6,4 a 25 µg/ml, e então incubadas por 30min a 37°C.

Após a incubação a suspensão de microrganismo e agente foi submetida a processo de lavagem e centrifugação, sendo inicialmente centrifugada por 10min a 3000rpm, retirado o sobrenadante e adicionado 2ml de PBS, repetindo-se o processo duas vezes. Para então por fim adicionar-se uma gota de 20 µl a placas de petri contendo meios especiais para determinação de atividade enzimática de fosfolipase e proteinase, consistindo o primeiro em ágar Sabouraud Dextrose modificado por cloreto de cálcio, cloreto de sódio e gema de ovo, e o segundo em ágar base acrescido de glicose base nitrogenada de levedura e albumina bovina.

Sendo a atividade enzimática determinada pela razão entre o tamanho da colônia e o tamanho do halo formado, denominada Zona de Precipitação (Pz), esta foi determinada pela comparação entre a Pz das diferentes concentrações e do controle, o qual consistiu em cepas sem o tratamento.

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Excel 2011 e a análise estatística foi realizada nos Programas SPSS 11.0 por teste de regressão linear.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados colhidos e análise estatística foi possível identificar efeito dose-resposta na relação entre a concentração da hidrazona e a produção enzimática de *C. albicans*, sendo observado efeito próximo da inibição total de fosfolipases na concentração de 25 µg/ml (Fig. 1), e redução de mais de 50% da produção de proteinases (Fig. 2).

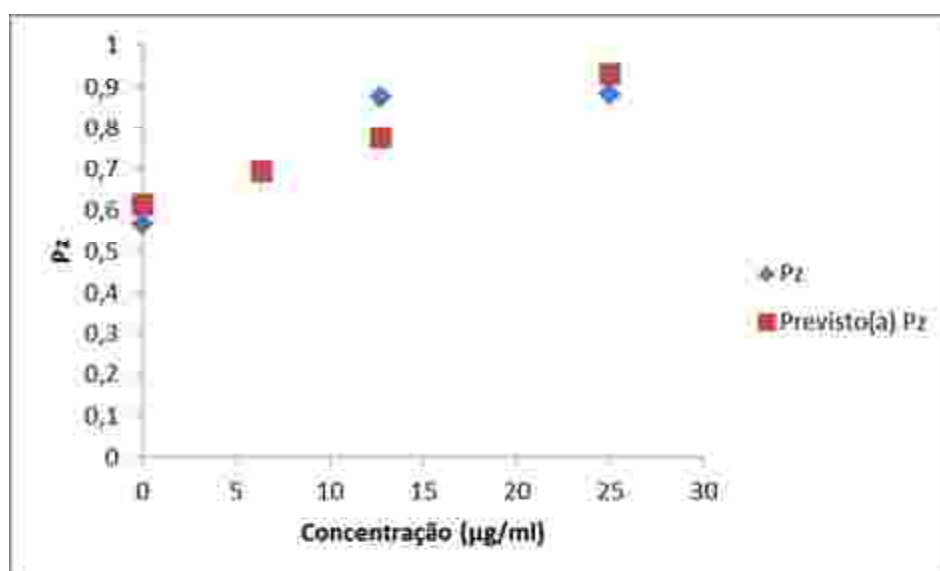


Figura 1- Curva dose resposta para inibição da produção de fosfolipase extracelular por *C. albicans* expostas a uma hidrazona ($R^2=0,79$. $P<0,05$)

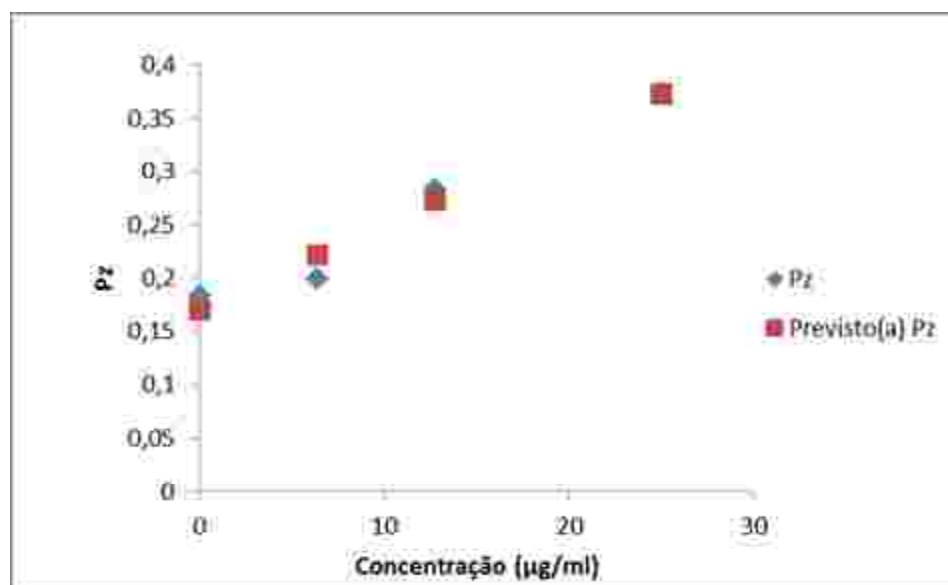


Figura 2 – Curva dose resposta para inibição da produção de proteínase extracelular por *C. albicans* expostas a uma hidrazona. ($R^2=0,97$. $P<0,05$)

A literatura atual suporta a busca por ações específicas dos fármacos antifúngicos pesquisados, sugerindo alteração do foco da pesquisa de novos agentes antifúngicos para ao invés de matar o microorganismo inibir seus fatores de virulência, reduzindo a possibilidade do desenvolvimento de resistência pelos microrganismos, e descreve metodologias para identificação desses fatores e inibição dos mesmos com doses baixas de antimicrobianos já utilizados. (BARROS et al., 2008; KADIR et al., 2007)

Entretanto pondera-se que um dos fatores de virulência mais difíceis de modular seja a produção de exoenzimas, efeito que drogas comerciais padronizadas em baixas concentrações se mostraram pouco eficientes, fator provavelmente relacionado a facilidade de adaptação desse fator de virulência por parte do microorganismo (CALAMARI et al., 2011), mas em contraponto, a substância testada *in vitro* no presente estudo apresentou resultados estatisticamente significantes na inibição de tal aspecto de virulência, indicando a possibilidade de um novo grupo de fármacos com ação específica, para o controle de afecções por *C. albicans*.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a hidrazona apresentou resultado eficaz na inibição da produção de exoenzimas em isolados de *C. albicans*, apontando para novas diretrizes na pesquisa por novos candidatos a fármacos antifúngicos, possibilitando a abertura de um leque de possibilidades para futuras pesquisas envolvendo todo o grupo de compostos da família das hidrazonas e seus derivados.

5 REFERÊNCIAS

BARROS, Letizia M.; BORIOLLO, Marcelo F.G.; ALVES, Ana Claudia B.A. et al. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p.1172-8, 2008.

CALAMARI, Silvia-Edith; BOJANICH, Maria-Alejandra; BAREMBAUM, Silvina-Ruth et al. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 16, n. 1, p. 23-8, 2011.

DUVAL, Auri R.; CARVALHO, Pedro H.; SOARES, Maieli C. et al. 7-Chloroquinolin-4-yl arylhydrazone derivatives: synthesis and antifungal activity. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 11, p. 1489–1495, 2011.

FERREIRA, Sabrina B.; GONZAGA, Daniel T.G.; SANTOS, Wilson C. et al. - lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. , **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-60, 2010.

KADIR, Tanju; GÜMRÜ, Birsay; UYGUN-CAN, Banu. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Archives of Oral Biology**, v. 52, p. 691-6, 2007.

LYON, Juliana P. & RESENDE, Maria Aparecida. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. **Oral Surgery, oral Medicine, oral Pathology, oral Radiology and Endodontology**, v. 102, n. 5, p. 632-8, 2006.

NEVILLE, Brad W. et al. **Patologia oral & maxilofacial 3ed**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008.

PINTO, Patrícia M; WEIKERT-OLIVEIRA, Rita de Cassia Botelho; LYON, Juliana P. et al. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. **Microbiological Research**, v. 163, n 5, p. 579-85, 2008.

VIEGAS Jr, Claudio; NICASTRO, Patrícia C.; FOSSALUZZA, Poliana C. et al. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 117-27, 2009.

WILLIS, Amanda M.; COULTER, Wilson A.; FULTON, Catherine R. et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surgery**, v.91, n.3, p.317-2, 2001