

## HIDRAZONAS DERIVADAS DE TIAZOLIDINONAS: AVALIAÇÃO DA REPRESSÃO ENZIMÁTICA DE *Candida albicans* E CITOTOXIDADE

**CARVALHO, Pedro Henrique de Azambuja<sup>1</sup>; DUVAL, Auri Rocha<sup>2</sup>; NEDEL, Fernanda<sup>3</sup>; LEITE, Fábio Renato Manzolli<sup>4</sup>; CUNICO, Wilson<sup>5</sup>; LUND, Rafael Guerra<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Faculdade de Odontologia, Bolsista PIBITI/FAPERGS; <sup>2</sup>UFPEL, Doutorando em Química; <sup>3</sup>UFPEL, Doutorado em Biotecnologia; <sup>4</sup>UFPEL, Faculdade de Odontologia, Departamento de Semiologia e Clínica; <sup>5</sup>UFPEL, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos; <sup>6</sup>UFPEL, Faculdade de Odontologia, departamento de odontologia restauradora. [rafael.lund@gmail.com](mailto:rafael.lund@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

A patogenicidade de leveduras do gênero *Candida* está relacionada ao desequilíbrio entre o hospedeiro e a levedura oportunista, assim como está associada à expressão dos fatores de virulência do fungo, como, por exemplo: adesão, aderência, formação de biofilme e produção de exoenzimas (LUND et al., 2010; DUVAL et al., 2011).

As exoenzimas mais importantes produzidas por espécies do gênero *Candida* são a fosfolipase (Ffp) e a proteinase (Pt). A primeira classe de enzimas está associada à degradação do substrato para invasão das leveduras aos tecidos do hospedeiro, e a segunda por sua vez é responsável pela quebra da adesão intercelular e age como facilitadora da penetração tecidual.

As hidrazonas são um grupo de compostos orgânicos intermediários para a síntese de inúmeros compostos químicos, incluindo as biologicamente valiosas tiazolidinonas. As hidrazonas já foram relatadas como potenciais antimaláricos, e recentemente foi publicado seu efeito antifúngico *in vitro* sobre cepas de *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp. (DUVAL et al., 2011).

A literatura atual suporta a busca por ações específicas dos fármacos antifúngicos, sugerindo alteração do foco da pesquisa de novos agentes antifúngicos para a inibição de fatores de virulência, assim como vem apresentando recentemente metodologias para identificação desses fatores e inibição dos mesmos com doses baixas de antimicrobianos já utilizados (TAWEECHAI SUPAPONG et al., 2006; KADIR et al., 2007; BARROS et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi determinar a ação de compostos pertencentes a família das hidrazonas sobre a produção de fosfolipase e proteinase por *C. albicans*, bem como a citotoxicidade desses compostos.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Os ensaios de avaliação antienzimática foram realizados de acordo com o preconizado por Kadir et al. (2007). Quinze hidrazonas foram testadas em diferentes concentrações, variando de 12,5 à 100 µg/ml, frente a oito cepas de *C. albicans*, obtidas de isolados clínicos de pacientes com estomatite protética, e armazenadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia Oral da UFPEL.

Inicialmente as cepas foram reativadas incubadas a 37°C por 24h em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (0,1%), para então posteriormente serem

suspensas em 2 ml de PBS (tampão fosfato salino) até igualar a escala optométrica de MacFarland 0,5. Cada concentração testada dos produtos foi diluída a 1% em PBS e, em seguida inoculadas com as cepas e incubadas por 30 minutos à 37°C. Logo após, os tubos contendo as cepas tratadas, foram centrifugados para decantação das células fúngicas, e na sequência, o sobrenadante com o produto foi removido, restando apenas o *pellet*, o qual foi lavado com PBS. Este processo foi repetido duas vezes. Finalmente, após a última lavagem, as suspensões das colônias de leveduras testadas, foram plaqueadas em ágar fosfolipase (ágar saboraud 65g, NaCl 57,3g, CaCl 0,55g e gema de ovo 40g em 1000L) e ágar proteinase (ágar base 20g, glicose 20g, base de levedura nitrogenada 1,45g, albumina bovina sérica 2g) e incubadas à 37°C por 96h e 72h, respectivamente.

A produção enzimática foi mensurada pela razão entre o diâmetro da colônia e o do halo de precipitação do substrato formado ao redor dessas, resultando no valor da zona de precipitação (Pz), os resultados foram comparados ao Pz do controle (cepa sem tratamento), para determinação da porcentagem de inibição enzimática.

Para avaliação de citotoxicidade (CT) foi utilizado o método colorimétrico, inicialmente fibroblastos de camundongo (NIH/3T3) congelados foram reativados por 48 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de l-glutamina, penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100mg/ml) até a obtenção de uma camada homogênea de células. As células foram suspensas com o uso de tripsina 0,125%, posteriormente neutralizada com SFB, adicionadas a um novo frasco de cultivo e novamente incubadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o crescimento, as células foram suspensas e distribuídas em placas de 96 poços, na concentração de 2x10<sup>4</sup> células/ml, e expostas à concentrações de 6,75, 12,5, 25, 50 e 100 µg/ml dos produtos testados. Após incubação por 24 e 48h, o agente foi lavado com PBS estéril e a células foram expostas ao reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT), à 5mg/ml de DMEM, e incubadas por 5h, após este período o corante MTT foi removido e os cristais de formazan foram extraídos das mitocôndrias com o uso de Dimetilsulfóxido (DMSO), para a leitura da absorbância em espectrofotômetro. Todos os testes foram realizados em triplicata, e para citotoxicidade o DMSO puro foi utilizado como controle.

As substâncias químicas foram obtidas no Laboratório de Química Aplicada à Bioativos (LAQuiABio) da UFPEl de acordo com a metodologia publicada recentemente pelo grupo de pesquisa do Prof. Wilson Cunico. (DUVAL et al., 2011)

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 15 hidrazonas, com a mesma estrutura básica variando a posição e o tipo de substituinte ligado ao anel benzênico (Fig. 1). Dos compostos testados, foi possível observar que cinco apresentaram uma expressiva repressão enzimática para Pt e Ffp. Foram testadas concentrações sub antifúngicas, obtidas a partir de dados da literatura (DUVAL et al., 2011), e para os compostos que apresentaram melhor efeito observou-se inibição de exoenzimas acima de 40% para Ffp e acima de 20% para Pt. O composto mais efetivo foi aquele que teve como radical o flúor na segunda posição, inibido 74% de Ffp e 23% de Pt na concentração de 25µg/ml (Tab. 1).

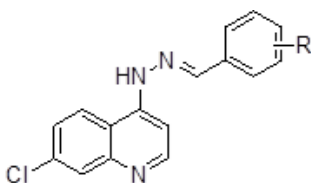


Figura1. Estrutura geral das hidrazonas

Todos os compostos testados possuem a mesma estrutura base, entretanto os efeitos na repressão enzimática foram dispares o que pode indicar uma dependência da associação entre a estrutura base e o substituinte, para o efeito desejado. Ainda assim, não foi possível racionalizar uma relação entre a estrutura e a atividade das hidrazonas testadas.

A produção de exoenzimas é considerada um dos fatores de virulência de inibição mais difícil (CALAMARI et al., 2011), e no presente estudo sua inibição atingiu padrões elevados pelos novos compostos testados. Atualmente a busca por novos fármacos antimicrobianos tem mudado o foco, buscando não mais compostos que levem a morte celular do microorganismo, mas que ajam inibindo sua virulência e favorecendo o sistema imune do hospedeiro, visando evitar o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. (KADIR et al., 2007; BARROS et al., 2008).

Com relação à CT (Tab. 2), observou-se que os compostos testados apresentaram viabilidade celular inferior a 50% do controle nas suas concentrações mais altas, entretanto nas concentrações que apresentaram atividade anti-enzimática os compostos com substituinte 4-CH<sub>3</sub> e 3-NO<sub>2</sub> apresentaram viabilidade celular de 79% e 53% respectivamente. Já o composto 2-F, em contraponto ao seu excelente desempenho como repressor enzimático apresentou viabilidade celular de 10% na concentração de 25 µg/ml, No entanto, na concentração de 12,5 µg/ml a viabilidade celular elevou-se para 65% em 24h, e a repressão enzimática caiu para 71% em relação à Ffp e 12% em relação a Pt (DUVAL et al., 2011). A concentração mais alta do produto que mantém viabilidade celular acima de 50% é utilizada como referência para o efeito citotóxico, no caso dos compostos testados o composto 4-CH<sub>3</sub> apresentou viabilidade celular acima de 50% em uma concentração 4 vezes maior que aquela efetiva para repressão enzimática (DUVAL et al., 2011; UBOLDI et al., 2012).

Tabela 1. Concentrações e compostos mais efetivos na inibição de exoenzimas de *C. albicans*

Subst.	Conc. (µg/ml)[µM]	Pz Ffp controle	Pz Ffp teste	Inibição Ffp (%)	Pz Pt controle	Pz pt teste	InibiçãoPt (%)
2-F	25[83]	0,55±0,04	0,88 ± 0,06	74	0,15 ± 0,02	0,38 ± 0,09	23
3-CN	50[163]	0,51±0,06	0,71 ± 0,08	42	0,2 ± 0,04	0,38 ± 0,26	23
3-OCH <sub>3</sub>	50[160]	0,56±0,13	0,73 ± 0,17	45	0,48 ± 0,82	0,24 ± 0,05	24
3-NO <sub>2</sub>	50[153]	0,62±0,111	0,78 ± 0,08	42	0,15 ± 0,03	0,26 ± 0,08	12
4-CH <sub>3</sub>	25[85]	0,66±0,11	0,75 ± 0,07	26	0,14 ± 0,04	0,38 ± 0,09	20

Tabela 2. Percentual de viabilidade celular após 48h de exposição aos compostos químicos testados.

Radical	Concentrações (µg/ml)			
	6,25	12,5	25	50
2-NO <sub>2</sub>	31,0±2,8	32,7±0,5	17,4±0,8	12,6±2,0
2-Cl	86,7±7,7	31,8±3,6	45,2±5,3	23,8±8,6
3-F	78,2±11,5	53,0±5,8	26,8±4,5	5,5±1,3

4-F	65,2±5,6	59,3±0,5	29,2±2,3	25,5±3,6
3-OH	72,0±1,8	50,0±1,9	41,4±6,2	35,2±2,8
2-CN	47,1±9,2	49,0±5,4	33,6±4,3	35,7±5,4
4-CN	181,8±11,4	72,0±2,9	43,0±4,2	23,3±2,0
2-OCH <sub>3</sub>	68,6±14,4	36,5±9,0	20,9±5,1	9,5±3,3
3-OCH <sub>3</sub>	48,0±10,0	19,0±0,4	10,4±3,7	3,3±0,7
4-OCH <sub>3</sub>	107,0±17,8	75,1±10,6	53,3±10,1	34,7±12,5
2-OH	217,4±31,3	166,7±5,1	77,2±23,5	27,3±3,8

#### 4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados conclui-se que:

- 1) A família de produtos testada apresenta atividade de repressão enzimática sobre *C. albicans*, independente do substituinte vinculado à hidrazona;
- 2) Os produtos testados apresentaram citotoxicidade baixa nas concentrações de repressão enzimática significativa.

#### 5 REFERÊNCIAS

- BARROS, L.M.; BORIOLLO, M.F.; ALVES, A.C. 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. 1172-1178, 2008.
- CALAMARI, S. E.; BOJANICH, M. A.; BAREMBAUM, S. R. 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, A.R.; CARVALHO, P.H.; SOARES, M.C.; GOUVÊA, D.P.; SIQUEIRA, G.M.; LUND, R.G. and CUNICO, W. 7-Chloroquinolin-4-yl arylhydrazone derivatives: synthesis and antifungal activity. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 11, p. 1489-1495, 2011.
- KADIR, T.; GÜMRÜ, B.; UYGUN-CAN, B. 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. 691-696, 2007.
- LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; ETGES, A.; RIBEIRO, G.A.; ROSALEN, P.L.; and DEL PINO, F.A.B. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis. **Mycoses**, Berlim, v. 53, p.232-238, 2010.
- TAWEECHAI SUPAPONG, T.; KLANRIT, P.; SINGHARA, S.; PITIPHAT, W.; WONGKHAM, S. Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 414-417, 2006.
- UBOLDI, C.; GIUDETTI, G.; BROGGI, F.; GILLILAND, D.; PONTI, J.; ROSSI, F. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1-2, p. 11-20, 2012.