

ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, ANTIENZIMÁTICA E CITOTOXIDADE DE DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS

Oliveira, Simone Gomes Dias^{1*}; Pereira, Cláudio Martins Pereira²; Lund, Rafael Guerra³; Piva, Evandro⁴.

1- Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPel – Área: Materiais Dentários – Bolsista Capes – sisi_mone@hotmail.com

2- Departamento de Química Orgânica – UFPel - claudiochemistry@gmail.com

3- Departamento de Dentística Restauradora – FOP/UFPel – rafael.lund@gmail.com

4- Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPel – Área: Materiais Dentários – evpiva@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são encontradas na saliva de 30 a 60% dos indivíduos saudáveis (SILVA, 2009), sendo a espécie *C. albicans* a mais frequente isolada. Porém as espécies de *C. não-albicans* também têm sido relacionadas a cavidade oral e a casos de candidemias e resistência antifúngica (KRCMERY; BARNES, 2002). Uma das manifestações clínicas mais frequentes de candidíase oral é a estomatite protética. Esta condição patológica é caracterizada por eritema crônico localizado mais comumente no palato duro, sendo encontrado também em dorso de língua e outras interfaces da mucosa (REGEZI; SCIUBBA, 2000). Frequentemente, está associada com o uso de próteses dentárias e caracteriza-se por episódios recorrentes, sendo correlacionada com piores expectativas de vida para os pacientes (YOSHIDA et al., 2005). Diversos tratamentos vem sendo sugeridos para a estomatite protética. Dentre eles, substâncias químicas para desinfecção ou limpeza das próteses, como clorexidina e hipoclorito de sódio, (BARNABE et al., 2004). Geralmente, o que é utilizado são associações desses tratamentos com o uso de antifúngico tópico (CATALAN et al., 2008): polienios (Nistatina e Anfotericina B) e os azóis (itraconazol, miconazol e clotrimazol) (NEVILLE et al., 2004). Entretanto, alguns empecilhos como toxicidade, resistência e variabilidade de resultados vêm sendo observados (CASAROTO; LARA, 2010). Definitivamente, o conhecimento sobre as formas de evitar ou diminuir esse tipo de infecção na cavidade oral tornam-se imprescindíveis.

Os compostos heterociclicos vem despertando grande interesse devido a sua aplicabilidade nos mais diversos campos da química moderna e a enorme variedade e complexidade estrutural, que possibilita gerar uma vasta seriem de novas estruturas com propriedades físicas e químicas diversas. Dentre os compostos heterociclicos, merecem destaque os sistemas nitrogenados de cinco membros, especialmente os derivados de pirazois e pirrois, esses compostos contendo a unidade pirazol possuem um amplo espectro de atividades biológicas, tais como inibidor da monoamina oxidase, anticonvulsivante, antibacteriano hipotensores, antipiréticos e antiinflamatório. Com base nestas observações, propõem-se aqui a avaliação da atividade antifúngica sobre *Candida spp.* de novos 3,5-diaril-4,5-dihidro-1H-pirazol-1 carboximidamides, a subsequente avaliação da atividade antienzimática e citotoxicidade.

2. METODOLOGIA

2.1. Susceptibilidade Antifúngica (M27A3 - CLSI, 2008)

Para execução do teste de microdiluição, foram utilizadas *cepas*, provenientes do Laboratório de Microbiologia FOP-UFPel, de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata* e *C. lipolytica*. As cepas selecionadas foram cultivadas 24h antes do teste. Foram preparadas suspensões microbiana de 5 ml de solução salina obedecendo o teste de distorção e turbidez 0,5 na escala de MacFarland.

Após homogeneização, uma alíquota da suspensão (0,05 ml) foi dispersa em 4,95 ml de solução salina. Desta nova suspensão, foi retirada uma porção de 0,25 ml e depositada e homogeneizada ao RPMI (9,75 ml). Os Pirazóis foram dissolvidos para o teste em álcool etílico 70% e DMSO. Os compostos foram previamente pesados e dissolvidos em 500µg ml⁻¹ do solvente proposto. A partir da solução-mãe (500 µg ml) foram preparadas diluições seriadas para todos os compostos. As concentrações dos produtos testados tiveram uma variação de concentração de 0,49 a 500µg / ml. Para cada poço foi adicionado 100µl de produto preparado mais 100µl de preparo do inóculo. As placas foram incubadas a 36 °, e lidas às 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 proeminente inibição (50%) do crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo foi identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima). Cada inóculo do teste que não apresentou crescimento foram repicados em placas de ágar. Após 24 horas de incubação, a leitura foi determinada pelo crescimento visível de cepas. A partir disso para a determinação da CFM foi considerada a menor concentração que impediu crescimento visível.

2.2. Atividade Antienzimática

Para a avaliação da atividade antienzimática foram utilizados meios de cultura específicos de fosfolipase e proteinase. Foram utilizadas 16 cepas de *C. albicans* para esse teste. Estas cepas foram repicadas em meio Agar Sabouraud Dextrose 24 horas antes do teste. 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. Foi realizado uma diluição seriada dos Pirazóis em álcool 70°. As concentrações variaram de 500 µg/ml até 15,6 µg/ml. Misturou-se 20µL do produto, proveniente da diluição, com 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. Cada teste foi repetido duas vezes. Para a proteinase a leitura foi realizada em 72h. Já para o meio fosfolipase está ocorreu em 96h. Foi medindo 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). Para a proteinase: PZ = 1, Negativa; $PZ \geq 0,64 < 1$, Positiva-Média, $PZ \leq 0,63$ Positiva-Elevada. Já na fosfolipase: Pz=1 indicaram ausência de atividade enzimática e Pz=1 indicaram graus positivos de fosfolipase.

2.3. Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, foram utilizadas fibroblastos de rato (3T3/NIH) e os produtos testados foram preparados nas mesmas concentrações que o teste de microdiluição, porém a diluição dos pirazóis foram feitas em DMEM. A suspensão das células foi plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em uma placa de cultura celular (ELISA) de 96 poços com 200 µL de DMEM em cada cavidade. A placa então foi incubada a 37°C, em ambiente de 5% CO₂, por 24 h. Após este período o meio de cultura foi removido dos poços e volumes iguais (200 µL) dos compostos já diluídos foram adicionados em cada

poço. Nos poços controles, 200 µL de DMEM foram adicionados. Após a remoção dos extratos testes, 200 µL de PBS e 20 µL 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°C. Então o MTT foi aspirado e 200 µL 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 pirazóis apresentaram atividade antifúngica: CIM e CFM de (115,6 µg/ml [15,6 – 250]) para *C. albicans*; CIM e CFM de 62,5 µg/ml para *C. parapsilosis*; CIM e CFM de 62,5 µg/ml para *C. famata*; CIM e CFM de 125 µg/ml para *C. glabrata*; CIM de 15,62 µg/ml e comportamento fungistático para *C. lipolytica*. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada de acordo com o protocolo NCCLS M27-A, atualizada em 2002 (M27-A2). Este protocolo para a avaliação da atividade antifúngica de substâncias puras tem como vantagens: a reprodutibilidade no laboratório, custo e sensibilidade (Arthington et al., 2002). É importante salientar que essa técnica é 30 vezes mais sensível do que as outras descritas na literatura, requer uma pouca quantidade de cada amostra e pode ser utilizada para um grande número de amostras (Ostroski et al., 2008). Neste estudo, os compostos apresentaram resultados semelhantes de MIC e MFC. Esta é uma grande vantagem porque os medicamentos antifúngicos comerciais geralmente apenas evitam o crescimento de fungos. Em pacientes imunodeprimidos, apenas a inibição do fungos em crescimento pode não ser suficiente para impedir a difusão de *Candida* (Elewski e Ohio, 1993).

Os Pirazóis testados apresentaram ainda um efeito inibidor de proteinases [0,9(±0,074) e 0,3(±0,04)] e fosfolipases [0,6 (±0,024) e 0,2 (±0,022)] e baixa citotoxicidade. Em relação ao teste de citotoxicidade, quando foram comparados 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.

Em relação ao estudo estrutural, encontrou-se alta relação da aromatização do anel heterocíclico e a atividade antifúngica, sendo o posicionamento do grupo *metoxi* na posição *-orto* a de maior efeito. A lipofilicidade, mesmo fornecendo maior penetração celular, foi inversamente proporcional a atividade antifúngica.

4. CONCLUSÕES

Considerando-se inespecificidade terapêutica e resistência dos antifúngicos atuais, as novas formulações de pirazóis podem ser uma fonte alternativa para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; FRADE, J.P.; BRANDT, M.E.; HAJJEH, R. A.; HARRISON, L.H.; SOFAIR, A.N.; WARNOCK, D.W. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in

vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, 2477, 2002.

BARNABE, W.; DE MEDONCA, N.T.; PIMENTA, F.C.; PEGORARO, L.F.; SCOLARO, L.M. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, n.5, p. 453-9, 2009.

CASAROTO, A.R.; LARA, V.S. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. **Fitoterapia**, v.81, p.323-328, 2010.

CATALAN, A.; PACHECO, J.G.; MARTINEZ, A.; MONDACA, M.A. In vitro and in vivo activity of melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, n.105, p. 327- 32, 2008.

ELEWKI BE, OHIO C. Mechanism of Action of Systemic Antifungal Agents. **J Am Acad Dermatol**, v.28, p. 28-34, 1993.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. Causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v.50, p.243-60, 2002.

NEVILLE, B.W. Patologia Oral e Maxilofacial. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.183.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Rev Brás de Farmacognosia**, v.18, p. 301-307, 2008.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J. Patologia Bucal-Correlações Clinicopatológicas. 3.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000. p.0-25; 0-35; 76-80; 101.

SILVA, V.C.S. Avaliação antimicrobiana de antissépticos bucais e antifúngicos sobre *Candida* spp. isoladas na saliva de pacientes oncológicos. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

YOSHIDA, M., MORIKAWA, H., YOSHIKAWA, M, TSUGA, K., AKAGAWA, Y. Eighth-year mortality associated with dental occlusion and denture use in community-dwelling elderly persons. **Gerontology**, v. 22, p.234-7, 2005.