

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CHALCONAS

SIMONE GOMES DIAS DE OLIVEIRA¹; ISABEL LANGE FUNARI DE CARVALHO²; CLÁUDIO MARTINS PEREIRA DE PEREIRA³; ALEX FABIANI CLARO FLORES⁴; RAFAEL GUERRA LUND⁵; EVANDRO PIVA⁵.

¹ Pós graduanda do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – Bolsista CNPq – sisi_mone@hotmail.com

² Graduanda do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – Bolsista FAPERGS – iisabel.carvalho@hotmail.com

³ Laboratório de Heterocíclicos Bioativos e Bioprospecção (LAHBBio) da Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

⁴ Curso de Química de Alimentos da Universidade Federal de Rio Grande – alex@pesquisador.cnpq.br

⁵ Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – rafael.lund@gmail.com; evpiva@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de infecções orais de origem fúngica e/ou bacterianas ainda representam um grande e desafiador problema de saúde pública (DESSEN et al., 2001; TENOVER e MCDONALD, 2005). A busca por novos fármacos é importante devido a uma série de fatores, como a falta de seletividade das drogas, que levam aos efeitos colaterais indesejados, a resistência microbiana á fármacos convencionalmente utilizados, alta taxa de mutação bacteriana, entre outros (SALEH et al., 2010). Além disso, a cavidade oral apresentam desafios adicionais quanto ao seu tratamento, como por exemplo: a ação diluidora da saliva e as concentrações sub-terapêuticas consequentes dessa ação; a difícil administração local de antifúngicos e/ou antibacterianos e o desafio clínico já enfrentado pelos profissionais.

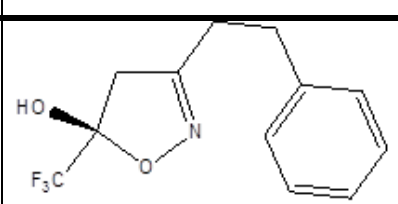
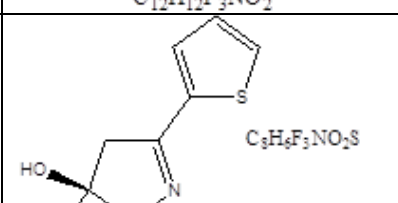
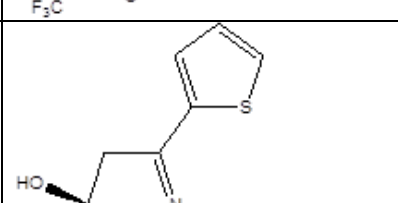
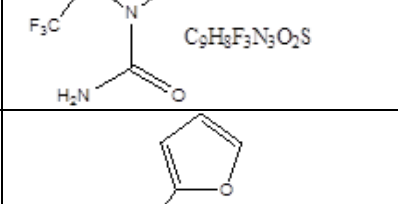
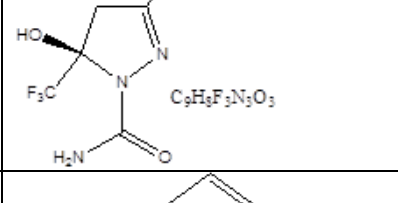
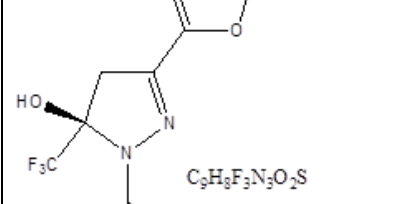
Em suma, o aumento da incidência de casos de infecções fúngicas e/ou bacterianas orais e a crescente evidência de resistência dos microbianos causadores de patologias orais de interesse clínico frente antifúngicos/ antibacterianos atualmente comercializados, torna imprescindível a descoberta de novas alternativas medicamentosas. Essas alternativas devem ser mais eficazes, menos tóxicas e mais baratas a fim de atender essa parcela da população.

As chalconas são moléculas caracterizadas como cetonas, encontradas em plantas rasteiras ou arbóreas, que devido as suas possibilidades de substituição em seus anéis aromáticos, podem resultar em múltiplos compostos com diferentes atividades biológicas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano de seis novos compostos derivados de chalconas substituindo-se diferentes ligantes nos anéis aromáticos.

2. METODOLOGIA

Os compostos derivados de chalconas que foram utilizados no decorrer desse trabalho foram sintetizados conforme descrito por PIZZUTI et al, 2009 e identificados por técnicas de espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, espectrometria de massas e por difração de Raios-X.

Tabela 1 – Novos Derivados de Chalconas: estrutura química, peso molecular, massa exata e concentrações utilizadas no teste de sensibilidade antimicrobiana

Composto	Estrutura	Peso molecular	Massa Exata	Milimolaridade (mM)	Concentração (µg/mL)
1	 $C_{12}H_{12}F_3NO_2$	259,22	259,08	1,9	500
				0,9	250
				0,48	125
				0,23	62,5
				0,12	31,25
2	 $C_8H_6F_3NO_2S$	237,2	237,01	2,1	500
				1	250
				0,52	125
				0,26	62,5
				0,13	31,25
3	 $C_9H_8F_3N_2O_2S$	279,24	279,03	1,7	500
				0,89	250
				0,44	125
				0,22	62,5
				0,11	31,25
4	 $C_9H_8F_3N_2O_3$	263,17	263,05	1,9	500
				0,95	250
				0,47	125
				0,23	62,5
				0,11	31,25
5	 $C_9H_8F_3N_2O_2S$	279,24	279,03	1,7	500
				0,89	250
				0,44	125
				0,22	62,5
				0,11	31,25
6	 $C_9H_5F_3N_2OS$	246,21	246,01	2	500
				1	250
				0,50	125
				0,25	62,5
				0,12	31,25

Foram utilizadas treze cepas de caráter patogênico: *Staphylococcus aureus* ATCC19095, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Enterococcus faecalis* ATCC4083, *Escherichia coli* ATCC29214, *Candida albicans* ATCC62342 e

isolados clínicos orais de espécies de *C. albicans* (3) e *C. não-albicans* (2). s ensaios de suscetibilidade foram realizados, sempre em triplicata, pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando uma versão modificada dos documentos de referência M27-A3 (CLSI, 2008) e M7-A7 (CLSI, 2006). Os produtos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e, a partir da solução-mãe, as concentrações foram obtidas por diluições seriadas de razão 10. As cepas foram reativadas 24h antes e suspensas em 5 mL de solução salina estéril até a obtenção de uma turbidez correspondente a 0.5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi ajustada para 10^7 UFC/ mL, diluindo-se essa suspensão inicial em salina estéril em uma razão de 1:100 e, posteriormente, em uma razão de 1:40 em meio de cultura. Os testes de suscetibilidade foram realizados em microplacas plásticas estéreis de 96 poços. Cada micropoço da placa conteve 100µL do inóculo final mais 100µL de cada concentração dos compostos. As colunas de controle positivo e negativo contiveram respectivamente 100µL de inóculo mais 100µL de meio de cultura e 100µL da suspensão do composto mais 100µL de meio de cultura. As microplacas foram lidas em leitor de microplaca (MR-96A, Mindray Shenzhen, China) a 590nm para fungos e a 630nm para bactérias (t=0),posteriormente incubadas em estufa a 37°C por 24h (para bactérias) e 48h (para fungos) e novamente lidas (t=1). A atividade antimicrobiana foi expressa em porcentagem de atividade (% AE) através da fórmula: $\% AE = 100 - (AE - AEB / AC - ACB) \times 100$ (STEIN et al., 2011). Onde: AE = Abs dos poços testes após incubação (t=1); AEB = Abs dos poços testes no t=0; AC = Abs do poço controle após incubação (100% crescimento); ACB = Abs do poço controle no t=0.Os pontos finais de IC50 foram determinados como a primeira concentração dos compostos que resultou em redução do crescimento do inóculo em 50% em relação ao poço controle de crescimento e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de produzir 100% de inibição do crescimento das cepas em relação ao poço controle positivo. Para a análise estatística dos dados coletados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), pelo qual os dados foram analisados através de regressão não linear.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os novos derivados de chalconas apresentaram os valores demonstrados no Quadro 2. A avaliação da atividade antifúngica e antimicrobiana foi realizada de acordo com o protocolo NCCLS M27-A, atualizada em 2002 (M27-A2). Este protocolo para a avaliação da atividade antifúngica e antimicrobiana 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, por exemplo. E em pacientes imunodeprimidos, apenas a inibição dos microrganismos em crescimento pode não ser suficiente para impedir a difusão de *Candida* (ELEWSKI E OHIO, 1993).

Tabela 2 – Resultados da avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana dos novos derivados de chalcona

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. albicans</i>
1	0,40 µg/mL [0,091 – 1,76]	-	-	-	173,4 µg/mL 142,1 – 407,9	674,2 µg/mL 122,1 – 3723	7,81 µg/mL -	2,29 µg/mL 0,037 – 141,5
2	0,30 µg/mL 0,066 – 1,36	-	-	0,75 µg/mL 0 – 1,019	1,15 µg/mL 0,010 – 122,9	425 µg/mL -	17,35 µg/mL 1,122 – 268,2	18,38 µg/mL 9,11 – 37,07
3	0,37 µg/mL 0,08 – 1,66	-	-	-	10,41 µg/mL 0,70 – 152,9	1,51 µg/mL 0,58 – 3,92	1,30 µg/mL -	1,40 µg/mL 1,21 – 1,62
4	0,17 µg/mL 0,048 – 0,65	-	-	0,13 µg/mL 0,02 – 9,43	335,2 µg/mL 140,2 – 801,7	3,58 µg/mL -	-	0,56 µg/mL 0,061 – 5,19
5	1130 µg/mL 204,9 – 6234	-	-	0,70 µg/mL 0,11 – 4,47	0,41 µg/mL 0,043 – 3,87	-	4,83 µg/mL 0,012 – 1919	275,4 µg/mL 188,6 – 402,3
6	0,23 µg/mL 0,034 – 1,64	-	-	-	360 µg/mL 55,28 – 2344	-	1,052 µg/mL -	1,90 µg/mL 1,44 – 2,51

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os compostos testados demonstraram atividade antimicrobiana. Isso demonstra que substâncias derivadas de chalconas apresentam potencial para uso em terapêutica de doenças infecciosas na odontologia.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, p. 2477- 2483, 2002.
- ELEWKI BE, OHIO C. Mechanism of action of systemic antifungal agents. **Journal of American Academy of Dermatology**, Massachussets, v.28, p. 28-34, 1993.
- 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, p. 301-307, 2008.
- DESSEN, A., DI GUILMI, A.M., VERNET, T., DIDEBERG, O. Current drug targets. **The Journal of Infectious Disorders**. Oxford, v.1, p. 63- 65,2001
- SALEH, M.; ABBOTT, S.; LAUZON, V.C.; PENNEY, C.; ZACHARIE, B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V.3, p.20-33, 2010.



