

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXICIDADE DE UMA CLASSE DE FLAVONAS

OLIVEIRA, Simone Gomes Dias¹; PEREIRA, Cláudio Martin²; LUND, Rafael Guerra³; PIVA, Evandro⁴

¹Mestranda do Programa de Pós Graduação em Odontologia (FOP-UFPe) e Bolsista PIBIC-CNPq;

²Professor do Departamento de Química Orgânica (IQG/UFPe); ³ Professor do Departamento de Odontologia Restauradora (FOP/UFPe); ⁴Orientador e professor do Departamento de Odontologia Restauradora (FOP/UFPe) - rafael.lund@gmail.com

Rua Gonçalves Chaves, 457 / Sala 504 – Centro – CEP 96015-560 - Pelotas-RS. E-mail:

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, apesar de grandes avanços na saúde bucal coletiva, a demanda por próteses totais ainda configura-se como uma das maiores necessidades e indicações reabilitadoras orais em edêntulos totais (BRASIL, 2004). Esses aparelhos reabilitadores acabam interferindo diretamente na microbiota oral podendo proporcionar um ambiente favorável ao desenvolvimento de algumas infecções (CARLSSON, 1998). Entre essas, as infecções fúngicas têm sido cada vez mais descritas, e as leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 8-10% das infecções oportunistas, sendo considerada um importante patógeno merecedor de plena atenção (MARCHINI et al., 2004; RAMAGE et al., 2004). A *Candida albicans* ainda é a espécie mais frequentemente isolado nestes casos, entretanto, espécies de *Candida* não-*albicans* podem também estar envolvidas com menos frequência, como por exemplo, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. krusei* (CASTRO, 2004; SHAFER, 1987).

Definitivamente, o conhecimento sobre as formas de evitar ou diminuir as infecções por *Candida* sp. na cavidade oral tornam-se imprescindíveis. Tendo em vista as dificuldades encontradas no tratamento de infecções fúngicas, alguns autores recomendam o isolamento do agente causador da infecção e a determinação das concentrações inibitória e fungicida mínimas das drogas que podem ser utilizadas (BATISTA et al., 1999).

No entanto, a interação entre drogas antifúngicas e fungos, fungos e hospedeiro e entre a droga antifúngica e o hospedeiro é muito complexa. Estabelecer a atividade antifúngica de uma nova droga *in vitro* oferece apenas uma parte da informação necessária para predizer o resultado do tratamento da infecção com um novo fármaco. Por outro lado, o aprimoramento dos ensaios *in vitro* e dos testes de susceptibilidade frente ao surgimento constante de novas drogas, torna os ensaios *in vitro* ferramentas indispensáveis e significativas para contribuir, na maioria das vezes, da seleção do agente antifúngico mais indicado (JOHNSON et al., 2008).

O uso empírico de plantas medicinais para combater patologias já foi muito utilizado nos primórdios da humanidade e hoje essas plantas servem como guia para apoiar a descoberta de novos fármacos. Um dos principais grupos de compostos fenólicos encontrados em plantas são os flavonóides. Sabe-se há muitos anos que essa classe de compostos de origem vegetal possui potencial bioativo. Esses flavonóides são subdivididos de acordo com a sua estrutura química e entre essas subdivisões encontram-se as flavonas. Algumas atividades biológicas importantes já são atreladas às flavonas, entre elas destacam-se: propriedades

antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antiaterosclerótica e antitumoral (Midleton et al, 2000).

Por tudo isso, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o potencial antifúngico dessa classe de flavonoides, além de avaliar o efeito citotóxico desses compostos.

2. METODOLOGIA

2.1. Susceptibilidade Antifúngica (Teste de Microdiluição em Caldo)

Para execução do teste de microdiluição, foram utilizadas *cepas de Rhodotorula mucillaginosa, Candida albicans, C. parapsilosis, C. famata, C. glabrata e C. lipolytica*. Essas cepas foram coletadas de pacientes atendidos no Centro de Diagnósticos de Doenças da Boca (CDDB), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FOP- UFPel). Estes pacientes deveriam usar próteses totais ou parciais e serem diagnosticados portadores de estomatite protética. Os espécimes foram semeados em Sabouraud Dextrose Agar com 0.2mg/mL de cloranfenicol e incubados a 37°C por 24 - 48h. Depois do isolamento da levedura foram realizados vários testes a fim de identificar as cepas. As cepas selecionadas foram cultivadas 24h antes do teste a fim de se preparar o inóculo. 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).

As flavonas foram dissolvidas para o teste em álcool etílico 70%. 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 resultando em concentrações seriadas para todos os compostos. As concentrações dos produtos testados teve uma variação de concentração de 0,49 a 250µg / 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 de microtitulação estéreis (Nuclon^{®1}) com 96 poços de fundo chato, constituídos em oito séries identificadas de A a H, cada qual com doze poços. 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, seguindo o protocolo M-27A3 (CLSI, 2008). 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. Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, foram utilizadas 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 2×10^4 células por poço e distribuídas em uma placa de cultura celular (ELISA) de 96 poços com 200 μ L 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 μ L) dos compostos já diluídos foram adicionados em cada poço. Nos poços controles, 200 μ L de DMEM foram adicionados. Após a remoção dos extratos testes, 200 μ L de PBS e 20 μ 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°C. Então o MTT foi aspirado e 200 μ 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 e CFM de 62,5 μ g/ml para *C. albicans*; CIM de 0,48 μ g/ml e comportamento fungistático para *Rhodotorula mucillaginosa* e *C. parapsilosis*; CIM e CFM de 62,5 μ g/ml para *C. famata* e *C. glabrata*; CIM de 15,62 μ g/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).

Como resultado para o teste de citotoxicidade, esses produtos mostraram uma baixa toxicidade contra fibroblastos 3T3/NIH nas concentrações das flavonas testadas. 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

A atividade antifúngica e o baixo potencial citotóxico demonstrado por essas flavonas revelam uma classe de compostos químicos promissora para desenvolvimento de novos antifúngicos. No entanto, mais estudos farmacológicos serão necessários para confirmar esta hipótese.

5. REFERÊNCIAS

- Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh R A, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW. 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* 2002, 46: 2477.
- Batista, J.M.; Birman, E.G.; Cury, A.M. Suscentibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*. 1999, 13, 343-348.
- Brasil. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil: Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003 – Resultados Principais., DF: Ministério da Saúde, 2004. 68p.
- Carlsson, G.E. Clinical morbidity and sequelae of treatment with complete dentures. *Journal of Prosthetic Dentistry*, St Louis, v.79, n.1, p.17-23, Jan, 1998.
- Castro, J.G. Assistência ao Recém-Nascido de Risco. Paulo R. Margotto, 2ª Edição, 2004.
- Elewski BE, Ohio C. Mechanism of Action of Systemic Antifungal Agents. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 28-34.
- Johnson E.M. Issues in antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61: 1, i13-i18.
- Marchini, L; Tamashiro, E; Nascimento, D.F.; Cunha, V.P.; Self Reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and the relationship to the condition of the oral tissues. *Gerodontology*, Oxford, v.21., n.4, p.226-228, Dec.2004
- Midleton, E. et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, Bethesda, v.52, p. 673 – 751, 2000.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Rev Brás de Farmacognosia* 2008; 18: 301-307.
- Ramage, G.; Tomsett, K.; Wickes, B.L.; Lopez-Ribot, J.L.; Redding, S.W. Denture Stomatitis: a role for *Candida* Biofilms. *Oral surgery, oral medicine, oral Phatology, oral radiology, and endodontics*, St. Louis, v.98, n.1, p.53-59, Jul.2004.
- Shafer, W.G. et al. *Tratado de patologia bucal: doenças de origem microbiana*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. 837p