



Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*

Diorgenes Pinto Santana¹; Tiago de Freitas Ribeiro²; Evandro Leão Ribeiro³; Gilberto Lúcio Benedito de Aquino⁴; Plínio Lázaro Faleiro Naves^{5*}

^{1,2,4,5} Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

³ Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

RESUMO

Candida albicans é uma levedura oportunista que apresenta um conjunto de fatores de virulência que conferem uma maior patogenicidade a estes micro-organismos. Neste trabalho foram estudadas a expressão de determinados fatores de virulência de *C. albicans* isoladas de cavidade bucal, com ênfase na formação de biofilme, e a atividade antifúngica e o impacto de concentrações subinibitórias de derivados de chalconas na formação de biofilme por estes micro-organismos. Os compostos foram avaliados quanto à toxicidade pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina* e determinação da dose letal a 50% (DL₅₀) ao micro-crustáceo. Nas chalconas sintetizadas, manteve-se o grupamento hidroxil no anel B e foram feitas modificações no anel A que resultaram em diferenças na toxicidade dos compostos variando de 714,3 a 1798,1 µg/mL. As leveduras expressaram de forma variável os fatores de virulência com predomínio de alta produção de fosfolipases, aspartil proteinases e com formação do tubo germinativo em até duas horas. A formação de biofilmes foi categorizada em dois grupos distintos nos quais 16 (48%) leveduras foram consideradas como formadoras fracas e 17 (52%) como formadoras fortes. A susceptibilidade as chalconas foi > 1000 µg/mL exceto para (E)-1-fenil-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona que apresentou uma concentração inibitória mínima de 62,5 µg/mL para os isolados e de 250 µg/mL para a cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Entretanto, concentrações subinibitórias das chalconas apresentaram uma significativa atividade inibitória da formação de biofilme por *C. albicans*, com graus de inibição variando de 75 a 90%, o que indica a potencial utilização destes compostos na inibição deste importante fator de virulência.

Palavras-chave: Biofilme. *Candida albicans*. Fator de virulência. Chalcona.

INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* são consideradas micro-organismos oportunistas reconhecidas por sua maior patogenicidade e alta incidência em infecções nosocomiais, geralmente não ocasionam processos patológicos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e sob terapia antimicrobiana por um período prolongado (Naglik *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2009; Suzuki, 2009).

Os fatores de virulência destas leveduras têm um papel essencial na gênese do processo infeccioso. Aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica (*switching*), produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os seus principais fatores de virulência (Ribeiro, 2008).

Além disso, *C. albicans* é considerada como a levedura patogênica com maior capacidade de crescer em biofilmes. Esta capacidade propicia um aumento na persistência da levedura e facilita a colonização, invasão e disseminação do processo infeccioso (Ruiz, 2006).

Neste contexto, e devido ao aumento da incidência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis, os produtos naturais oriundos de plantas são cada vez mais estudados e considerados como potenciais fontes de novos compostos com atividade antimicrobiana (Messier, *et al.*, 2011).

Dentre os produtos do metabolismo secundário estão presentes substâncias com estrutura básica de chalconas que na atualidade podem ser isoladas de plantas ou produzidas sinteticamente. Chalconas são cetonas α,β -insaturadas, nas quais um anel aromático está diretamente ligado à carbonila (anel A) e o outro ao carbono β da função olefínica (anel B), conforme Figura 1. Podem ser classificadas biologicamente pertencem a família das fitoalexinas produzidas durante a biossíntese de flavonóides (Hadacek, 2002).

Tais compostos apresentam, em seu esqueleto, um sistema bastante conjugado capaz de conferir pigmento amarelo às pétalas de algumas plantas de uso medicinal. Por outro lado, também podem ser encontrados em caules,

Autor correspondente: Plínio Lázaro Faleiro Naves, Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. E-mail: plinionaves@gmail.com

raízes, folhas, frutos e sementes (Zuanazzi, 2001). Seus dois estereoisômeros, Z e E, (Figura 2) são precursores comuns na biossíntese de flavonóides e isoflavonóides (Nowakowska, 2007).

Entretanto, estudos demonstraram que, em extratos vegetais, o produto majoritário isolado é o isômero trans, uma vez que estes são considerados mais estáveis termodinamicamente (Hijova, 2007). Estes compostos têm se mostrado promissores como protótipos para a inibição do crescimento de fungos (Nielsen *et al.*, 2004; Shaharyar *et al.*, 2006).

Diante do potencial de utilização das chalconas e da relevância dos biofilmes na erradicação de leveduras tanto de tecidos como de superfícies inertes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilme por *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal e o impacto de derivados de chalconas na inibição desta modalidade de crescimento microbiano, por meio de ensaios de suscetibilidade das formas planctônicas e sésseis.

Adicionalmente, foi avaliada a toxicidade das chalconas frente ao micro-crustáceo *Artemia salina* devido ao fato de que esta triagem possui uma boa correlação com atividades biológicas de diversos compostos (Pisutthanan *et al.*, 2004; Krishnaraju *et al.*, 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese de chalconas

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* e utilizados sem tratamento prévio. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatoplaques de sílica gel 160 HF254 (*Merck*), com 0,20nm de espessura. As manchas foram visualizadas utilizando radiação na região do UV (254 e 360 nm) e solução de vanilina ácida como revelador. Para determinação do grau de pureza dos produtos foi utilizada cromatografia em fase gasosa (CG) em cromatógrafo VARIAN-3900 equipado com uma coluna capilar Factor Four 1ms (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme) e detector de ionização em chama. O ponto de fusão foi determinado em aparelho Microquímica MQAPF-301.

As estruturas das chalconas sintetizadas foram confirmadas por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear e Infravermelho. Os espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T), operando a 500 MHz ¹H e 125 MHz ¹³C, equipado com uma sonda de 5 mm de detecção inversa com gradiente de campo. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (δ = ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz).

As multiplicidades dos sinais foram expressas conforme descrito: s=singlete, d=dubleto, dd=duplo dubleto, t=tripleto e m=multiplete. A visualização dos espectros foi realizada por meio do programa ACD LABS 12.0. Os espectros na região do infravermelho foram

obtidos a partir de pastilhas de KBr em equipamento FT-IR PERKINELMER 1620, com varredura na região de 650 a 4000 cm⁻¹.

As chalconas foram sintetizadas através da reação geral de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, com diferentes aldeídos aromáticos substituídos e a p-hidroxacetofenona 2 via catálise ácida ou básica, conforme procedimentos 1 e 2 (Figura 3).

Procedimento 1: Síntese das chalconas I, II e IV via catálise básica.

As acetofenonas foram dissolvidas em metanol sobre banho de gelo, com agitação. A seguir, foi adicionada solução metanólica de NaOH (50% p/v) e, em seguida os benzaldeídos substituídos. A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse tempo a reação foi vertida em água gelada e acidificada com solução de HCl 50% (Domeneghini, 2006).

Procedimento 2: Síntese da chalcona III via catálise ácida.

A chalcona III foi sintetizada utilizando SOCl₂ como catalisador. A mistura de 4-nitroacetofenona e 4-hidroxibenzaldeído, em quantidades equimolares, foi mantida sob agitação em etanol por 2h. Após esse tempo foi deixada em repouso por 12 horas e então vertida em água gelada. O precipitado foi filtrado e lavado com etanol a frio, o sólido obtido foi recristalizado em etanol (Jayapal *et al.*, 2010).

Dados analíticos:

(E)-1-(4-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)-prop-2-en-1-ona(I)

Sólido amarelo (432,0 mg, 72%); pf:173,0-174,8°C; RMN de ¹H (CDCl₃, 500MHz): δ s 3.92 (s, 3H_s), 5.43 (s, 1H), 6.91 (d, 2H, J=8.55 Hz), 7.01 (d, 2H, J=9,16 Hz), 7.45 (d, 1H, J=15.56 Hz), 7.58 (d, 2H, J=8.54 Hz), 7.79 (d, 1H, J=15.56 Hz), 8.06 (d, 2H, J=8.85 Hz). RMN de ¹³C (CDCl₃-d₄, 125 MHz): δ 55.48 (OCH₃Ph), anel Ph. (113.83; 115,95; 128,01;130,31; 130,71; 131,36; 163,157,80; 34), olefina (119,69; 143.81), 188.92 (C=O). IV (KBr) 3208 (OH), 1680 (C=O) cm⁻¹; Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₃.

(E)-1-(4-hidroxifenil)-3-(4-metilfenil)-prop-2-en-1-ona (II)

Sólido amarelo (474,0 mg, 79,0%); pf:162,4-165,7°C; RMN de ¹H (CDCl₃, 500MHz): δ s 2.46 (s, 3 H), 5.71 (s, 1 H), 6.91 (d, 2H, J=8.85 Hz), 7.32 (d, 2H, J=7,93 Hz), 7.43 (d, 1H, J=15.87 Hz), 7.58 (d, 2H, J=8.24 Hz), 7.79 (d, 1H, J=15.56 Hz), 7.95 (d, 2H, J=8.24 Hz). RMN de ¹³C (CDCl₃, 125MHz): δ 24,20 (CH₃Ph), Anel Ph. (119,51; 122,29; 130,32; 132,22; 132,94;134,35; 149,13; 164,18), olefina (122,29; 147,63), 194,89 (C=O). IV (KBr) 3201 (OH), 1650 (C=O) cm⁻¹; Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₂.

(E)-1-(4-hidroxifenil)-3-(4-nitrofenil)-prop-2-en-1-ona (III)

Sólido alaranjado (435 mg, 87%); pf:162,0-163,9°C; RMN de ¹H (Metanol-d₃, 500 MHz): δs 4,56 (s, 1H), 6,88 (d, 2H, J=8,55 Hz), 7,58 (d,1H, J=15,56 Hz), 7,67 (d, 2H,

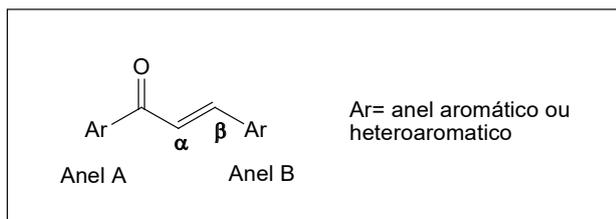


Figura 1: Estrutura geral das chalconas

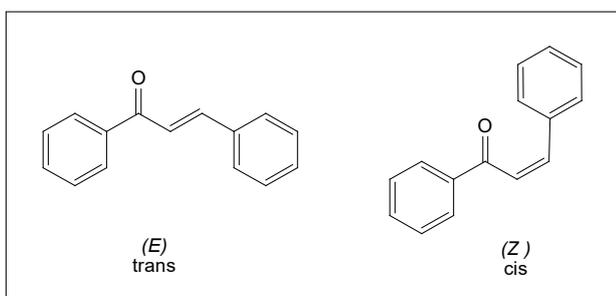


Figura 2: Estereoisômeros de chalconas.

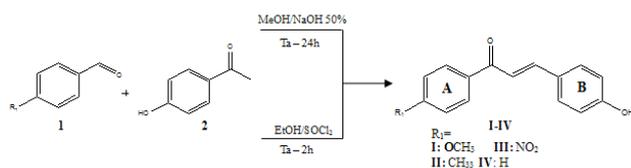


Figura 3: Síntese de chalconas

J=8,55 Hz), 7.82 (d, 1H, J=15.87 Hz), 8,26 (d, 2H, J=8.85 Hz), 8.40 (d, 2H, J=8.85 Hz). RMN de ^{13}C (Metanol- d_3 , 125 MHz): δ Anel Ph. (115,68; 117,96; 126,05; 129,21; 130,82; 147,01; 150,10; 160,80), olefina (123,39; 143,37), 189,54 (C=O). IV (KBr) 3206 (OH), 1694 (C=O) cm^{-1} ; Fórmula molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_4$.

(E)-1-(4-hidroxifenil)-3-fenil-prop-2-en-1-ona (IV)

Sólido amarelo (524,0 mg, 81%); pf:135,8-136,1°C; RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ s 6,84 (d, 2H, J=8,76 Hz), 7.55 (d,1H, J=14.96 Hz), 7.58 (d, 2H, J=8,75 Hz), 7.65 (d, 1H, J=14.96 Hz), 7,72 (d, 2H, J=8.85 Hz), 8.10 (d, 2H, J=8.85 Hz). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ Anel Ph. (115,68; 117,96; 126,05; 129,21; 130,82; 147,01; 150,10; 160,80), olefina (123,39; 143,37), 189,54 (C=O). IV (KBr) 3223 (OH), 1624 (C=O) cm^{-1} ; Fórmula molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$.

Ensaio de Letalidade com Artemia salina

O ensaio de toxicidade em placas microtiter contendo 96 poços consistiu na incubação de cistos de *A. salina* em água salina (sal marinho 40 g/L) por um período de 48 horas a temperatura ambiente (22-29 °C). Os compostos foram diluídos em série e suspensões homogêneas de náuplios contendo 10-15 larvas (100 μl) foram transferidas para cada poço, logo a placa foi incubada a temperatura

ambiente por 24 horas. Posteriormente as placas foram examinadas utilizando o estereoscópio óptico e o número de larvas mortas (imóveis) contabilizado em cada poço. Em seguida, as larvas vivas foram inativadas com 100 μl de metanol em cada poço e após 15 minutos de exposição o número total de náuplios foi contado e a dose letal a 50 % (DL_{50}) ao micro-crustáceo foi calculada pelo método PROBIT de análise (Molina, *et al.*, 2006).

Caracterização dos Fatores de Virulência de C. albicans

Foram estudadas 33 *C. albicans*, sendo 32 amostras isoladas de cavidade bucal e identificadas pelos aspectos fenotípicos das colônias formadas, segundo Kreegen-Van Rij, 1984 e Lacaz *et. al.*, 1991 e a cepa *C. albicans* ATCC 10231.

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 h a 37 °C para realização dos testes de enzimatipagem para a detecção da produção de aspartil proteinases e tubotipagem utilizando soro fetal bovino para evidenciação do tubo germinativo (Rüchel *et al.*, 1982).

Determinação de susceptibilidade in vitro

Todas as amostras de *C. albicans* foram testadas quanto a suscetibilidade aos compostos estudados, seguindo a metodologia proposta por Messier *et al.* (2011) com pequenas modificações. As chalconas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em caldo YNB com 0,1 % de dextrose a concentrações que variaram de 1000 a 0,9 $\mu\text{g/mL}$. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2 %.

O inóculo foi ajustado com a escala 0,5 McFarland, seguido de diluição a 1/100 em caldo YNB, obtendo-se assim uma concentração de aproximadamente 5×10^4 ufc/mL. As placas foram incubadas a 48 °C durante 37 °C horas.

Após a incubação foi realizada a leitura visual a qual permitiu definir a CMI como a menor concentração do composto que resultou na inibição do crescimento visível nos poços teste em relação aos poços controle. Em seguida foram realizadas leituras espectrofotométricas utilizando leitora de microplaca TP-Reader NM Thermo Plate, as quais possibilitaram a determinação da CMI de ao menos 50% das leveduras em cada poço.

Formação de Biofilme

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados em meio de cultura saliva artificial segundo Gal *et al.* (2001) que após a esterilização por filtração foi armazenado em geladeira até o momento do uso, por um período máximo de uma semana.

Sucintamente, as leveduras foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose a 37 °C por 48 horas, em seguida foram transferidas três colônias para tubos de ensaio com 5 mL de caldo Sabouraud dextrose incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 20 μL do caldo crescido, com inóculo variando entre 3×10^7 a $1,8 \times 10^8$ UFC/mL foram transferidas para poços com 180 μL de saliva artificial

em placas microtiter de poliestireno sem tratamento para adesão celular, que foram incubadas por 24 horas a 37°C (Jain *et al.*, 2007).

Após a incubação, as placas foram processadas segundo metodologia descrita por Naves *et al.*, (2008), com a determinação do crescimento total (CT) pela medida da densidade óptica a 630 nm, seguida da remoção do caldo crescido, lavagem dos poços com solução fisiológica e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos, após esse período o corante foi desprezado e os poços lavados quatro vezes com 300 µL de água destilada. As placas foram incubadas a 37 °C por 20 minutos para secagem, posteriormente adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto em cada poço durante 5 minutos.

Em seguida as densidades ópticas foram lidas a 492 nm. As leituras de densidade óptica permitiram o cálculo do índice de formação específica de biofilme por meio da fórmula $FEB = LA - PC/CT$, na qual LA = levedura aderida, PC = poço controle não inoculado e CT = crescimento total.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

Para análise da correlação entre a FEB e a expressão dos demais fatores de virulência foi utilizada o teste Fisher com $p < 0,05$.

Impacto de concentrações subinibitórias das chalconas na formação de biofilme

As amostras de *Candida albicans* foram cultivadas na presença de concentrações subinibitórias das chalconas conforme a metodologia descrita nos estudos de formação de biofilme. Para avaliar se as diferenças foram significativas foi empregado o teste t Student pareado, com $p < 0,05$.

RESULTADOS

*Síntese das chalconas e toxicidade pelo ensaio de letalidade com *Artemia salina**

Na tabela 1 são mostradas as chalconas sintetizadas, nas quais foi mantido o grupamento hidroxil no anel B e foram feitas modificações no anel A além dos valores de DL_{50} . Os resultados mostraram que a dose letal a 50% das *A. salina* detectada por este ensaio, só foi atingida com altas concentrações das chalconas o que indica uma baixa toxicidade dos compostos.

*Caracterização dos fatores de virulência de *C. albicans**

Detectaram-se 23 (71,8%) amostras com alta atividade enzimática de aspartil proteinase, enquanto que para fosfolipase foram observadas 24 (75%) com alta atividade enzimática.

Todas as amostras de *C. albicans* analisadas induziram a formação de tubos germinativos dentro de duas horas, sendo que houve uma quantidade expressiva de leveduras capazes de formá-lo em uma hora (Tabela 2).

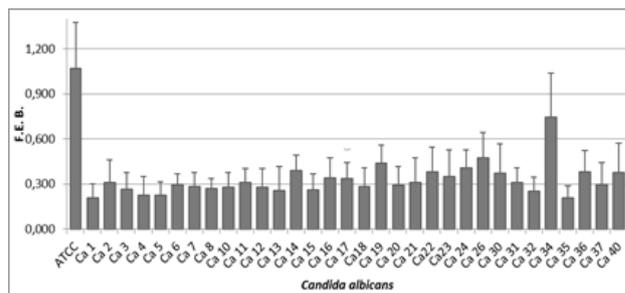


Gráfico 1. Índice de Formação Específica de Biofilme por *C. albicans*

FEB - Formação Específica de Biofilme

ATCC - *Candida albicans* ATCC 10231

Ca - *Candida albicans*

Determinação de suscetibilidade in vitro

As amostras de *C. albicans* mostraram-se sensíveis aos antifúngicos convencionais, com as CMI variando para a anfotericina B de 0,08 – 1,00 µg/mL, para o fluconazol de 0,25 – 4,00 µg/mL, para o itraconazol de 0,08 – 1,00 µg/mL e para a 5-fluorocitosina de 0,024 – 1,56 µg/mL.

Verificou-se que as CMI de cada chalcona foi a mesma contra as leveduras com exceção da chalcona IV conforme a tabela 3.

Formação Específica de Biofilme

No gráfico 1 são apresentados os índices de formação específica de biofilme. Todas as leveduras foram capazes de formar biofilme, ainda que em graus variáveis. Levando-se em conta a média global dos índices de FEB calculados (0,306), a habilidade de formar biofilmes foi categorizada em dois grupos distintos de leveduras, as formadoras fracas com 16 (48%) isolados e as formadoras fortes de biofilme, 17 (52%).

Verificou-se que não houve correlação entre expressão dos fatores de virulência estudados e a ocorrência simultânea da formação de biofilme de *C. albicans*.

Impacto de concentrações subinibitórias das chalconas na formação de biofilme

As concentrações testadas foram de 0,45 µg/mL para chalconas I, II e IV, e 0,9 µg/mL para chalcona III. Estas concentrações foram definidas como a metade da CMI capaz de inibir < 50% das leveduras nos ensaios de determinação da susceptibilidade.

Os resultados observados na tabela 4 mostram o impacto de concentrações subinibitórias das chalconas na formação de biofilme em meio saliva artificial pelas leveduras estudadas.

Os resultados na tabela 5 demonstram que a inibição foi um fenômeno dependente das chalconas e das leveduras. Foram observados graus significativos de inibição da formação de biofilme pelas amostras por concentrações subinibitórias dos compostos testados, sobretudo pela chalcona I.

Tabela 1. Compostos sintetizados e DL₅₀ contra *Artemia salina*

Chalconas	Código	DL ₅₀ (µg/mL)
(E)-1-(4-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	I	1798,1
(E)-1-(4-metilfenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	II	1241,6
(E)-1-(4-nitrofenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	III	714,3
(E)-1-fenil-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	IV	1264,7

Tabela 2. Fatores de virulência evidenciados em *Candida albicans*

Fatores de virulência	<i>Candida albicans</i>		
		n = 32	%
Produção de fosfolipases	Alta	24	75,0
	Baixa	8	25,0
Produção de aspartil proteinases	Alta	23	71,8
	Baixa	9	28,2
Tempo de formação do tubo germinativo	1 hora	15	46,8
	2 horas	17	53,2

Tabela 3. Atividade antimicrobiana das chalconas contra *C. albicans*

Chalconas	Isolados de <i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
	CMI (µg/mL)	CMI (µg/mL)
I (R – CH ₃ O)	> 1000	> 1000
II (R – CH ₃)	1000	1000
III (R – NO ₂)	1000	1000
IV (R – H)	62,5	250

DISCUSSÃO

A escolha das chalconas baseou-se na atividade relatada por Batovska *et al.*, (2007) que sintetizaram uma série de chalconas com diversas substituições nos anéis aromáticos, principalmente no anel B e analisaram os efeitos eletrônicos provocados por esses substituintes sobre *C. albicans*.

A atividade antifúngica destas substâncias foi correlacionada com a localização do grupo hidroxil no anel B das chalconas, corroborando os resultados encontrados neste estudo, pois nas chalconas sintetizadas, a manutenção do grupamento hidroxil no anel B e as modificações no anel A, resultaram em diferenças na toxicidade expressada pela DL₅₀ de *A. salina*, o que poderia indicar uma correlação da toxicidade dos compostos derivados.

A dose tóxica para *A. salina* geralmente está situada num intervalo de 10 a 100 vezes mais elevados em comparação com métodos de culturas celulares humanas e de outros animais. Desta forma, este ensaio caracteriza-

se como método amplamente utilizado nos estudos preliminares de citotoxicidade (Pelka *et al.*, 2000; Carballo *et al.* 2002).

Os fatores de virulência expressados pela levedura foram variáveis com predomínio de alta produção de fosfolipases, aspartil proteinases e com formação do tubo germinativo em até duas horas, o que poderia facilitar a instalação de um processo infeccioso por *C. albicans* nos pacientes.

Diversos estudos têm demonstrado variações na produção enzimática com a produção de aspartil proteinases entre 68,7% e 100% das amostras e de fosfolipases entre 71,9% e 100% por *C. albicans*, isoladas de pacientes com diversas condições clínicas, reforçando a relevância destas enzimas como fator de virulência (Cândido *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2002; Mardegan *et al.*, 2006).

A análise da formação de tubo germinativo por *C. albicans* denota a capacidade de aderência destas leveduras à mucosa do hospedeiro. O polimorfismo de *C. albicans* tem papel preponderante na virulência, mediante a passagem da forma leveduriforme - infectante para a filamentosa - parasitária (Lacaz *et al.*, 1998; Sidrim & Rocha, 2004).

As propriedades antifúngicas das chalconas e derivados vêm sendo crescentemente descritas na literatura (Nowakowska, 2007; Tristão, 2008). Tais estudos avaliam a relação entre estrutura - sobretudo com a adição de substituintes nas moléculas, com alterações na bioatividade, notadamente em busca de uma atividade inibitória mais pronunciada contra os micro-organismos patogênicos.

Dentre as chalconas sintéticas avaliadas neste trabalho, manteve-se o substituinte hidroxil na posição para do anel B, além desta molécula avaliaram-se três substituintes diferentes na posição para do anel A quanto à sua atividade antifúngica, os resultados confirmam a ação da chalcona com o grupo hidroxil (chalcona IV) e demonstram que as três chalconas com modificações no anel A não obtiveram um ganho no potencial inibitório de *C. albicans*.

Um dos mais importantes fatores de virulência da espécie de *C. albicans* é a sua habilidade em formar biofilmes. Tais estruturas assumem grande importância no contexto clínico porque estão associadas com a persistência do micro-organismo no processo infeccioso e capacidade de expressar resistência contra a maioria dos agentes antimicrobianos (Henriques *et al.*, 2006).

Neste estudo não foi detectada correlação entre a formação de biofilme e a expressão dos demais fatores de virulência, fato que sugere que a habilidade de formar biofilme é uma propriedade independente da produção de fosfolipases, aspartil proteinases e formação do tubo germinativo.

A formação de biofilmes é uma estratégia para a sobrevivência e proliferação no ambiente bucal. A complexa estrutura de um biofilme permite a organização das populações de *C. albicans* de modo a oferecer proteção contra os mecanismos de remoção pela saliva e dificultar a ação de agentes antimicrobianos (Hofling *et al.*, 2004).

Tabela 4. Formação específica de biofilme das cepas expostas a concentrações subinibitórias de chalconas

Leveduras	Controle +		Chalcona I		Chalcona II		Chalcona III		Chalcona VI	
	Med	SD	Med	SD	Med	SD	Med	SD	Med	SD
ATCC	1,070	0,306	0,097	0,030*	0,028	0,020*	0,070	0,010*	0,041	0,030*
Ca 1	0,208	0,094	0,189	0,061	0,114	0,085	0,128	0,032*	0,165	0,013
Ca 2	0,312	0,150	0,135	0,027*	0,142	0,088*	0,123	0,029*	0,165	0,066
Ca 3	0,266	0,110	0,140	0,045*	0,127	0,027*	0,113	0,018*	0,157	0,053
Ca 4	0,228	0,120	0,132	0,016	0,072	0,017*	0,059	0,037*	0,073	0,019
Ca 5	0,229	0,083	0,131	0,028*	0,164	0,130	0,180	0,057	0,219	0,062
Ca 6	0,296	0,073	0,139	0,029*	0,119	0,071*	0,167	0,076*	0,101	0,063*
Ca 7	0,285	0,092	0,148	0,042*	0,249	0,150	0,155	0,084*	0,131	0,068*
Ca 8	0,271	0,067	0,111	0,044*	0,140	0,036*	0,144	0,076*	0,103	0,019*
Ca 10	0,281	0,093	0,120	0,017*	0,123	0,038*	0,158	0,096*	0,111	0,084*
Ca 11	0,311	0,094	0,102	0,032*	0,120	0,058*	0,164	0,069*	0,162	0,048*
Ca 12	0,278	0,125	0,100	0,018*	0,164	0,055	0,147	0,035	0,107	0,041*
Ca 13	0,260	0,158	0,073	0,009*	0,218	0,106	0,113	0,023	0,161	0,019
Ca 14	0,393	0,098	0,036	0,020*	0,091	0,019*	0,046	0,035*	0,088	0,064*
Ca 15	0,261	0,106	0,066	0,027*	0,103	0,054*	0,110	0,009*	0,140	0,079*
Ca 16	0,341	0,132	0,100	0,066*	0,154	0,081*	0,097	0,026*	0,095	0,056*
Ca 17	0,338	0,107	0,074	0,043*	0,118	0,087*	0,054	0,031*	0,135	0,080*
Ca 18	0,284	0,124	0,148	0,034*	0,160	0,034	0,113	0,040*	0,197	0,094
Ca 19	0,440	0,120	0,107	0,085*	0,173	0,068*	0,136	0,086*	0,153	0,123*
Ca 20	0,294	0,120	0,069	0,084*	0,117	0,079*	0,100	0,055*	0,218	0,111
Ca 21	0,312	0,161	0,067	0,063*	0,100	0,077*	0,071	0,030*	0,162	0,063*
Ca 22	0,382	0,164	0,054	0,017*	0,068	0,039*	0,180	0,168	0,102	0,082*
Ca 23	0,350	0,179	0,067	0,057*	0,059	0,036*	0,068	0,065*	0,119	0,065*
Ca 24	0,411	0,116	0,068	0,041*	0,063	0,033*	0,147	0,072*	0,122	0,036*
Ca 26	0,475	0,169	0,116	0,049*	0,085	0,055*	0,145	0,064*	0,198	0,059*
Ca 30	0,138	0,080	0,078	0,028	0,102	0,084*	0,140	0,037	0,113	0,03
Ca 31	0,312	0,096	0,109	0,026*	0,109	0,081*	0,164	0,079*	0,119	0,097*
Ca 32	0,254	0,091	0,165	0,060	0,147	0,091*	0,086	0,067*	0,078	0,063*
Ca 34	0,749	0,287	0,041	0,016*	0,032	0,012*	0,037	0,018*	0,048	0,052*
Ca 35	0,211	0,078	0,082	0,037*	0,138	0,09	0,179	0,058	0,295	0,052
Ca 36	0,383	0,139	0,099	0,022*	0,110	0,099*	0,173	0,043*	0,081	0,049*
Ca 37	0,300	0,141	0,058	0,037*	0,053	0,031*	0,045	0,042*	0,089	0,005*
Ca 40	0,377	0,193	0,131	0,03*	0,084	0,059*	0,087	0,012*	0,110	0,063*

Tabela 5. Inibição da formação de biofilme por concentrações subinibitórias das chalconas avaliadas.

Chalconas	Concentração (µg/mL)	Número de cepas n = 32	Grau de inibição da FEB (%)
I	0,45	29	90
II	0,45	26	81
III	0,9	27	84
IV	0,45	24	75

Lopes *et al.*, (2001) demonstraram que chalconas, com substituintes diferentes nos anéis A e B, possuem atividade antifúngica contra dermatófitos. Segundo este estudo, alguns dos derivados das chalconas e análogos atuam na inibição da biossíntese de um ou de ambos polímeros da parede celular de fungos.

Notavelmente, foi observado neste estudo que embora as chalconas apresentassem uma baixa ação antifúngica, possuíam uma capacidade significativa para inibir a formação de biofilmes por *C. albicans*.

Batovska *et al.* (2007) estudaram 44 chalconas e descobriram que todas eram moderadamente ativas contra o crescimento de *C. albicans*, apresentando CMI que oscilaram entre 31,0 e 62,5µg/mL. De acordo com esses pesquisadores os compostos com ação sobre *C. albicans* são dependentes da habilidade da chalcona em interagir com grupo sulfidrila das proteínas formadoras da membrana celular da levedura.

Adicionalmente, propriedades superficiais das células são alteradas quando estas são expostas a concentrações subinibitórias de anfotericina B e itraconazol, este fato sugere que os antifúngicos em concentrações baixas são particularmente úteis na inibição de mecanismos

de resistência como a aderência e posteriormente a formação e biofilme (Cardoso, 2005).

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Goiás e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão das bolsas e incentivo à pesquisa.

ABSTRACT

Action of chalcones against biofilm formation of Candida albicans

***Candida albicans* is an opportunistic yeast that has a number of virulence factors that increase pathogenicity of these micro-organisms. In this study the expression of certain virulence factors were studied of *C. albicans* isolated from the oral cavity with emphasis on biofilm formation and antifungal activity and the impact of subinhibitory concentrations of derivatives of chalcones in biofilm formation by these micro-organisms. The compounds were evaluated for toxicity testing of brine shrimp lethality and determination of 50% lethal dose (LD50) to the micro-crustacean. In synthesized chalcones, remained grouping the hydroxyl in ring B and ring modifications were made on the resulting differences in toxicity of the compounds ranging from 714.3 to 1798.1 µg/mL. Yeasts shown variable expressed virulence factors with prevalence of high production of phospholipases, aspartyl proteases and formation of germ tube within two hours. The biofilm formation was categorized into two distinct groups in which 16 (48%) yeasts were considered as poor and 17 trainers (52%) as forming strong. Susceptibility was chalcones ≥ 1000 µg/mL except for (E)-1-phenyl-3-(4-hydroxyphenyl) prop-2-en-1-one, which showed a minimum inhibitory concentration of 62.5µg/mL for the clinical isolates and 250µg/mL for the strain of *C. albicans* ATCC 10231. However, subinhibitory concentrations of chalcones showed significant inhibitory activity of biofilm formation by *C. albicans* with degrees of inhibition ranging from 75 to 90%, indicating the potential use of these compounds in the inhibition of this important virulence factor.**

Keyword: Biofilm formation. *Candida albicans*. Virulence factor. Chalcone.

REFERÊNCIAS

Batovska D, Parushev St, Slavova A, Bankova V, Tsvetkova I, Nonova M, Najdenski H. Study on the substituent's effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. Eur J Med Chem. 2007;42(1):87-92.

Cândido RC, Azevedo RVP, Komeau MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas na mucosa bucal. Rev Soc Bras Med Trop. 2000 33(5):437-42.

Carballo JL, Hernández-Inda ZLH, Pérez P, García-Grávalos MD. A Comparison Between two Brine Shrimp Assays to Detect *in vitro* Cytotoxicity in Marine Natural Products. BMC Biotechnol. 2002;2(17):1-5.

Cardoso BC. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. [Dissertação]. Minho. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2004.

Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter-associated infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(1):1-8.

Gal J, Fovet Y, Adib-Yadzi M. About a synthetic saliva for *in vitro* studies. Talanta. 2001;53(6):1103-5.

Hadacek F. Secondary metabolites as plant traits: Current and future perspectives. Clin Rev Plant Sci. 2002;21(4):273-322.

Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilms in terms of biomass and activity. Br J Biomed Sci. 2006;63 (1):5-11.

Hijova E. Bioavailability of Chalcones. Bratisl Lek Listy. 2006;107(3):80-4.

Hofling JF, Berres LM, Aives ACBA, Mariano PLS, Gonçalves RB. Colonização bucal por espécies de *Candida*: Adesão, formação de biofilme e interações microbianas. Rev Fac Odontol. 2004;9(1):22-6.

Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm Formation by and Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates from Urine. Appl Environ Microbiol. New York. 2007;73(6):1697-1703.

Krishnaraju Alluri V. *et al.* Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. Int J Appl Sci Eng. 2005;3(2):125-34.

Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier; 1998.

Lopes NS. *et al.* *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. Bioorg Med Chem. 2001;9(8):1999-2013.

Mardegan RC, Klein MI, Golvea MB, Rodrigues JAO, Gonçalves RB, Höfling JF. Biotyping and genotyping diversity oral *C. albicans* strains from caries-free and caries-actives healthy children. Braz J Microbiol. 2006;37(1):26-32.

Martins CAP, Santos SSF, Loberto JS, Koga-Ito CY, Jorge OC. Presença *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. Cienc. Odontol. Bras. 2002;5(3):75-85.

Matos BM, Komiyama EY, Balducci I, Koga-Ito CY. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha*

- piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Rev Odontol UNESP, Araraquara. 2009;38(4):244-48.
- Messier C, Epifano F, Genovese S, Grenier D. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. Phytomedicine. 2011; 18(5):380-3.
- Molina MGS, Salvador SF. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Pharmacol online. 2006;3:633-8.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003;67(3):400-28.
- Naves P, Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Dhahi G, Blanco M, Ponte MC, Soriano F. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. Microb Pathogen. 2008;45(2):86-91.
- Nielsen SF, Boesen T, Larsen M, Schonning K, Kromann H. Antibacterial Chalcones – Bioisosteric Replacement of the 4'-Hydroxy Group. Bioorg Med Chem. 2004;12(11): 3047-54.
- Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. Eur J Med Chem. 2007;42(2):125-37.
- Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A New Screening Test for Toxicity testing of Dental Materials. J Dent. 2000;28(1):341-5.
- Pisutthanan S, Plianbangchang P, Pisutthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. Naresuan Univ J. 2004;12(2):13-8.
- Ribeiro EL. Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down: aspectos fenogênéticos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas. [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília, UnB; 2008.
- Ruchel R, Teseller R, Trost MA. A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. Sabouraudia. 1982;20:233-44.
- Ruiz FJG. Estudo Retrospectivo Correlacionando a Frequência de Isolamento de Leveduras do Gênero *Candida* ao Estado Imunológico de Pacientes em Hospital Geral: Análise de Cinco Anos. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa; 2006.
- Shaharyar M, Siddiqui AA, Ali MA, Sriram D, Yogeeswari P. Synthesis and *in vitro* Antimycobacterial Activity of N1-nicotinoyl(4'-hidroxy-3'-metyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines. Bioorg Med Chem Lett. 2006;16(15):3947-9.
- Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Suzuki LC. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. [Tese]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo; 2009.
- Zuanazzi JAS. Flavonóides. In: Simões CMO. *et al.* Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 4ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/UFSC; 2002. p. 499-526.
- Tristão TC. Triagem para a atividade antimicrobiana e potencial tóxico de uma nova série de chalconas sintéticas e seus derivados análogos. [Dissertação]. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí. 2008.

Recebido em 16 de agosto de 2013

Aceito em 10 de dezembro de 2013