ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL –
PNQM13

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* APÓS TRATAMENTO COM DERIVADOS CINÂMICOS

J.N. BARBOZA¹, A.J.M.S. OLIVEIRA¹, A.F.M. MONTEIRO¹, A.R. FERREIRA¹, B. C.CAVALCANTI⁴, C.R.SILVA³, C.S.M. BEZERRA-FILHO¹, J.B. A. NETO³, H.I. F. MAGALHÃES¹, H.V. N. JÚNIOR³, M. C. MORAIS¹, R.H. N. SILVA¹, R.S. CAMPOS³, T.C.LIMA², D.P. DE SOUSA^{1*}

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brasil

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

³ Departamento de Análise Clínica e Toxicológica, Escola de Farmácia, Laboratório de Bioprospecção e Experimentos em Leveduras, LABEL, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

E-mail para contato: damiao_desousa@yahoo.com.br

*RESUMO – Na última década, a incidência das infecções fúngicas sistêmicas aumentaram de forma intensa e devido às limitações das terapias antifúngicas se dá a necessidade de desenvolver novos agentes antimicóticos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antifúngico de um conjunto de ésteres derivados do ácido cinâmico frente à *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. A preparação dos ésteres foi realizada via esterificação de Fischer e a atividade antifúngica medida pelo método de microdiluição em microplacas para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM). Verificou-se que a ferulato de metila (7) exibiu a melhor atividade antifúngica, com valores de CIM = 62,5, 31,25 e 62,5 µg/mL em relação a espécies de *Candida* testadas. Portanto, foi traçada uma relação estrutura-atividade preliminar, permitindo uma melhor otimização dessa classe de compostos.*

Palavras chave: Atividade antimicrobiana, Candida, Ácidos cinâmicos, Produto natural.

*ABSTRACT - In the last decade, the incidence of systemic fungal infections has increased intensively, and due to the limitations of antifungal therapies, new antifungal agents have to be developed. Thus, the objective of the present study was to investigate the antifungal potential of a set of esters derived from cinnamic acid against *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. The ester preparation was carried out via Fischer esterification and antifungal activity*

measured by microdilution method on microplates to determine minimum inhibitory concentrations (MIC). It was found that methyl ferulate (7) exhibited the best antifungal activity, with MIC values = 62.5, 31.25 and 62.5 µg/mL relative to Candida species tested. Therefore, a preliminary structure-activity relationship was drawn, allowing a better optimization of this class of compounds.

Keywords: Antimicrobial activity, Candida, Cinnamic acids, Natural Product.

1. INTRODUÇÃO

Na última década, a incidência das infecções fúngicas sistêmicas aumentaram, especialmente devido ao número de portadores imunocomprometidos. Devido às limitações das terapias antifúngicas disponíveis no mercado e aumento da resistência antimicrobiana, enfatizam a necessidade urgente de se desenvolver novos agentes antifúngicos eficientes de amplo espectro e principalmente com mecanismos de ação inovadores (SHARANAPPA, 2013). As espécies de *Candida* são amplamente distribuídas na natureza e constituem parte da microflora humana do trato gastrointestinal, cavidade oral e vagina. Clinicamente, as espécies de maior patogenicidade são *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (PFALLER et al., 2007).

Os compostos cinâmicos compreendem uma ampla classe de metabolitos secundários que possuem um grande espectro de propriedades biológicas, onde constatou-se que os mesmos foram eficientes para o tratamento de micoses sistêmicas e superficiais causadas por diferentes fungos patogênicos humanos (FARIA et al., 2011). O ácido cinâmico e seus derivados desempenham um papel importante na atividade antifúngica, como mostra o estudo de Heleno e colaboradores (2013) que relatou a atividade antifúngica do ácido cinâmico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Procedimento geral para a preparação dos ésteres

Inicialmente, uma mistura de ácido orgânico (0,5 g) e metanol (100 mL) foi aquecida sob refluxo na presença de ácido sulfúrico (0,8 mL). O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Em seguida, o metanol foi removido sob pressão reduzida, através do uso de rotaevaporador. O produto foi extraído com acetato de etila (30 mL). A fase orgânica foi neutralizada sucessivamente com bicarbonato de sódio a 5% e água, seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. Por fim, removeu-se o solvente por evaporação sob pressão reduzida.

2.2 Atividade antifúngica *in vitro*

O teste de susceptibilidade antifúngica de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando o caldo de RPMI (pH 7,0) tamponado com 0,165 mol de L⁻¹ 3- (N-morfolino) ácido propanossulfônico (MOPS; Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os compostos foram dissolvidos em DMSO e testados em concentrações que variaram de 1,95 a 1000 µg mL⁻¹. As leveduras e os compostos foram incubados em placas de cultura de 96 poços a 35 °C durante 24 h e os resultados foram examinados visualmente. A concentração mínima de inibição (CIM) de cada composto foi determinada como a concentração que inibiu 50% de crescimento fúngico. Os microorganismos utilizados neste estudo foram *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida albicans* ATCC 10231.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente investigação, uma série de oito derivados ésteres do ácido cinâmico com diferentes substituições no anel aromático foi avaliada *in vitro* para a sua atividade antifúngica em relação a três espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Foi determinada as concentrações mínimas inibitórias (CIM). Os resultados do teste de CIM, expresso em µg/mL, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações mínimas inibitórias (CIM) dos compostos 1-8.

Ésteres	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
					<i>C. albicans</i> (ATCC® 10231™)	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC® 22019™)	<i>C. krusei</i> (ATCC® 6258™)
1	H	H	H	H	250	250	250
2	OH	H	H	H	62,5	62,5	125
3	H	OH	H	H	250	250	250
4	H	H	OH	H	250	125	125
5	H	H	OH	OH	250	250	250
6	H	H	OCH ₃	H	250	250	250
7	H	OCH ₃	OH	H	62,5	31,25	62,5
8	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	250	125	125

Entre os oito derivados de ésteres avaliados, verificou-se que a ferulato de metila (7) exibiu a melhor atividade antifúngica, com valores de CIM de 62,5, 31,25 e 62,5 µg/mL em relação a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, respectivamente, seguido do *o*-cumarato de metila (2) (CIM de 62,5, 62,5 e 125 µg/mL, respectivamente).

A adição de um grupo hidroxila no anel aromático, resultou em maior ação antifúngica. Por exemplo, quando foi comparada a atividade dos compostos cinamato de metila (1), metil *o*-cumarato de metila (2), *m*-cumarato de metila (3) e *p*-cumarato de metila (4), foi encontrada atividade na ordem seguinte: 2 > 4 > 3 = 1 (CIM 62,5-125, 125-250, 250 e 250 µg/mL, respectivamente). Além disso, a posição do grupo hidroxila no anel aromático parece afetar a atividade, pois o composto 2 (CIM 62,5-125 µg/mL) foi mais ativo do que 3 (CIM 250 µg/mL) e 4 (CIM 125-250 µg/mL). Um estudo realizado por Kim et al. (2011), pode-se observar que vários benzaldeídos, como o 2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e o 2-hidroxi-5-metoxibenzaldeído, apresentaram uma potente atividade antifúngica contra diferentes fungos filamentosos, e uma análise de relação estrutura-atividade mostrou que o efeito antifúngico foi aumentado devido à presença de um grupo *o*-hidroxila no anel aromático. No entanto, a introdução de um segundo ou terceiro grupo hidroxila no anel aromático diminuiu o efeito antifúngico. Por exemplo, o composto de cafeato de metila (5) (CIM 250 µg/mL) foi menos bioativo do que o *p*-cumarato de metila (4) (CIM 125-250 µg/mL).

A presença do grupo 4-hidroxila em conjunto com um grupo metoxila adicionado na posição 3 do ácido *trans*-cinâmico foi importante para melhorar a atividade antifúngica, pois o composto (7), (CIM 31,25-62,5 µg/mL) foi mais potente do que os compostos 1 (CIM 250 µg/mL), 4 (CIM 125-250 µg/mL), 5 (CIM = 250 µg/mL) e 4-metoxicinamato de metila (6) (CIM 250 µg/mL). Além disso, o aumento de grupos

metoxila no anel aromático diminuiu o efeito antifúngico, pois o composto **7** (CIM 31,25-62,5 µg/mL) foi mais potente que o sinapato de metila (**8**) (CIM 125-250 µg/mL).

4. CONCLUSÃO

Portanto, neste estudo preparou-se um conjunto de derivados dos ácidos cinâmico, onde pode-se investigar sua atividade antifúngica frente à três cepas de *Candida*. Além disso, foi realizado um estudo preliminar de relação estrutura-atividade, permitindo o reconhecimento de alguns requisitos estruturais importantes para a atividade antifúngica, fornecendo informações para uma melhor otimização dessa classe de compostos como potenciais agentes antimicóticos.

5. REFERÊNCIAS

FARIA NCG, KIM JH, GONÇALVES LAP, MARTINS ML, CHAN KL, CAMPBELL BC. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Lett. Appl. Microbiol** 2011; 52: 506-513.

HELENO SA, FERREIRA ICFR, ESTEVES AP, CIRIC A, GLAMOCLIIA J, MARTINS A, SOKOVIC M, QUEIROZ MJRP. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food Chem. Toxicol** 2013; 58: 95–100.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, PROCOP GW, RINALDI MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. **J. Clin. Microbiol** 2007; 45(11): 3522–3528.

SHARANAPPA R, VIDYASAGAR GM. Anti-*Candida* activity of medicinal plants: a review. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci** 2013; 5(4): 9-16.

6. AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Universidade federal da Paraíba, pelo Laboratório de Química Farmacêutica e pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC / SE) - EDITAL FAPITEC / SE / FUNTEC/ CNPq N ° 10/2011.