

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

REALIZAÇÃO DE ENSAIOS PRELIMINARES COM A FINALIDADE DE
INVESTIGAR O MECANISMO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE UMA
NOVA NAFTOQUINONA SEMISSINTÉTICA (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-
d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) FRENTE A *Candida albicans* (ATCC 36232).

Bolsista: Sayuri Araújo Miki, FAPEAM

MANAUS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0190/2013

REALIZAÇÃO DE ENSAIOS PRELIMINARES COM A FINALIDADE DE
INVESTIGAR O MECANISMO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE UMA
NOVA NAFTOQUINONA SEMISSINTÉTICA (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-
d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) FRENTE A *Candida albicans* (ATCC 36232).

Bolsista: Sayuri Araújo Miki, FAPEAM
Orientadora: Prof^a. Msc. Alcinira Furtado Farias

MANAUS
2014

RESUMO

Atualmente, a busca de novos agentes antifúngicos vem crescendo, devido principalmente ao avanço da ocorrência de infecções fúngicas e a resistência aos fármacos antifúngicos existentes. A membrana e a parede celular fúngica são estruturas de importância médica, uma vez que os mecanismos de ação dos antifúngicos estão relacionados a estes alvos. Amplamente distribuídas na natureza, as naftoquinonas, por possuírem baixo grau de toxicidade e variadas atividades biológicas, dentre elas, a atividade antifúngica, despertam grande interesse. Portanto, este projeto pretendeu avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de uma nova naftoquinona semissintética IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) em cepas de *Candida albicans* (ATCC 36232) e investigar possíveis mecanismos de ação na parede e membrana celular, através dos ensaios de sorbitol, ergosterol e pela avaliação da liberação de material intracelular (efluxo de potássio intracelular e mensuração de extravasamento de nucleotídeos). A naftoquinona semissintética foi avaliada em ensaio de inibição do crescimento das hifas de *Candida albicans*, contudo a concentração inibitória mínima (CIM) da IVS320 permaneceu de 50 µg/mL para 50 µg/mL na presença do sorbitol 0,8 M, sugerindo que o composto não poderia exercer ação na parede celular fúngica. A CIM de IVS320 foi avaliada, ainda, através do ensaio ergosterol, porém não variou em diferentes concentrações de ergosterol exógeno, sugerindo que não apresenta este mecanismo de ação na membrana fúngica. Resultados demonstraram que houve efluxo de K⁺ das células fúngicas para o meio extracelular com a presença da naftoquinona semissintética, assim como o extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm, concluindo-se que o composto interfere na permeabilidade da membrana celular.

Palavras Chaves: naftoquinonas, mecanismo de ação, atividade antifúngica.

ABSTRACT

Nowadays, the search for new antifungal agents is increasing, mainly due to the occurrence of fungal infections progress and resistance of existing antifungal drugs. The membrane and the fungal cell wall are structures of medical importance, since the mechanisms of action of antifungal drugs are related to these targets. Largely distributed in nature, the naphthoquinones, for having a low degree of toxicity and varied biological activities, among them, the antifungal activity, arouse great interest. Therefore, this project intended to evaluate the in vitro antifungal activity of a new semisynthetic naphthoquinone IVS320 (1H-cyclopenta [b] naphtho [2,3-d] furan-5, 10 (3aH, 10BH)-dione) in strains of *Candida albicans* (ATCC 36232) and investigate possible mechanisms of action in the cell wall and membrane, through the trials of sorbitol, ergosterol and liberation of intracellular material (efflux of intracellular potassium and measurement of leakage of nucleotides). The semisynthetic naphthoquinone was evaluated in test hyphal growth inhibition of *Candida albicans*, however, the minimum inhibitory concentration (MIC) of IVS320 remained 50 $\mu\text{g/mL}$ to 50 $\mu\text{g/mL}$ in the presence of 0.8 M sorbitol, suggesting that compound could not act in the fungal cell wall. The MIC of IVS320 was evaluated also by ergosterol test, but cause no change in different concentrations of exogenous ergosterol, suggesting that this mechanism has no action in fungal membrane. Results showed that there was K^+ efflux of the fungal cells to the extracellular matrix in the presence of semisynthetic naphthoquinone as well as extravasament of substances that absorbing at 260 nm, concluded that the compound interferes in the cell membrane permeability.

Key Words: naphthoquinones, mechanism of action, antifungal activity.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	7
2.OBJETIVOS	8
2.1 Geral.....	8
2.2 Específicos.....	8
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 Fungos.....	8
3.2 Candida albicans.....	9
3.3 Agentes antifúngicos.....	9
3.4 Naftoquinonas.....	9
4. METODOLOGIA	10
4.1. Modelo de Estudo.....	11
4.2. Universo de Estudo.....	11
4.2.1 1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione.....	12
4.2.2.Drogas-padrão.....	12
4.2.3. Cepas padrão.....	12
4.2.4. Preparação do inóculo.....	12
4.2.5.Preparação dos antifúngicos.....	12
4.2.5.1 Para ensaio sorbitol.....	13
4.2.5.2 Para ensaio ergosterol.....	13
4.3. Ensaios.....	13
4.3.1 Ensaio Sorbitol.....	13
4.3.2 Efeito do ergosterol na CIM da naftoquinona.....	13

4.3.4 Mensuração do efluxo de potássio intracelular.....	14
4.3.4 Mensuração de extravasamento de nucleotídeos.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5.1 Ensaio Sorbitol.....	15
5.2 Ensaio Ergosterol.....	15
5.3 Ação sobre o efluxo de potássio.....	16
5.4 Extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm.....	17
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS.....	19
8. CRONOGRAMA.....	20

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas em humanos vem aumentando, representando um problema para a saúde devido a alta morbidade e mortalidade em todo o mundo. O tratamento das micoses não é sempre efetivo, pois os antifúngicos podem levar a recidiva das infecções e podem apresentar importante toxicidade (SHARON et. al., 2007).

O fungo *Candida albicans* é comensal em seres humanos, no entanto, muitas vezes torna-se patogênico, podendo resultar em infecções da corrente sanguínea em pacientes vulneráveis, com considerável morbidade. Infelizmente, nos últimos anos, as cepas de fungos difíceis de tratar, tais como as espécies de *Candida* resistentes aos azóis, assim como os fungos patogênicos e invasivos têm aumentado drasticamente (LEE, et al., 2012).

A terapêutica para tratamento das micoses causadas por *Candida spp.* e outras espécies fúngicas tem sido baseada na utilização de classes químicas diferentes de antifúngicos, tais como os polienos (Anfotericina B) e azóis (fluconazol e cetoconazol), equinocandinas (caspofungina), alilaminas (terbinafina) e análogos de pirimidinas (flucitosina) (GARNACHO-MONTERO et. al., 2011).

Segundo Yunes & Calixto (2001), a busca por novos agentes antifúngicos mais ativos, com menos efeitos colaterais e menos efeitos tóxicos é de grande importância no tratamento das infecções fúngicas.

Contudo, este projeto pretende quantificar a atividade dos extratos e compostos isolados de uma nova naftoquinona semissintética (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e investigar possíveis mecanismos de ação antifúngicos, pela avaliação da liberação de material intracelular e pelos efeitos de sorbitol e ergosterol frente a *Candida albicans* ATCC 36232.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Realizar ensaios preliminares com a finalidade de investigar o mecanismo da ação antifúngica de uma nova naftoquinona semissintética (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) frente a *C. albicans* ATCC 36232.

2.2 Específicos:

- ✓ Analisar a ação da naftoquinona semissintética sobre a parede celular fúngica.
- ✓ Analisar a ação da naftoquinona semissintética sobre a produção do ergosterol.
- ✓ Analisar a ação da naftoquinona semissintética sobre o efluxo de K^+ .
- ✓ Analisa a ação da naftoquinona no extravasamento de ácidos nucleicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos

Os fungos são classificados em seu próprio reino, Reino Fungi (*Myceteae*). Eles são organismos eucarióticos, distinguidos dos outros eucariotos por ter uma rígida parede celular composta de quitina e glucana e uma membrana celular na qual o colesterol é substituído por ergosterol como o componente principal de esterol (MURRAY, 2006).

Duas estruturas celulares fúngicas exibem importância médica, a membrana e a parede celular. O ergosterol é responsável por inúmeras características físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez. Sua ausência causa alterações na permeabilidade da membrana plasmática e inibição do crescimento (Santos e Carvalho, 2001; Thevissen et al., 2003 *apud* Leite et al.,2005). O ergosterol está envolvido também no funcionamento de várias enzimas que se ligam à membrana da célula do fungo, como a quitina sintetase, enzima importante para o crescimento e divisão celular (LEÃO RIBEIRO et al., 2004).

A parede celular dos fungos realiza funções essenciais para o desenvolvimento dos mesmos: dá proteção física contra outros microrganismos ou contra os fagócitos do hospedeiro, mantém o equilíbrio osmótico da célula, regula a forma da célula e também intermedia a comunicação entre as células fúngicas e reações enzimáticas. Alguns compostos antifúngicos inibem a síntese de quitina da parede celular, um polissacarídeo essencial para a manutenção da rigidez da estrutura da parede dos fungos, que não está presente em células de mamíferos (M. L. Maffei, 2007).

3.2 *Candida albicans*

De acordo com Cavassani et al. (2002), a candidíase é uma micose ocasionada por fungos do gênero *Candida*, constituído de 81 espécies, pertencentes à família *Cryptococcaceae*. Em que dentre essas espécies, a mais conhecida e de maior importância clínica é *C. albicans*. A maioria dos estudos mostra que a espécie *C. albicans* constitui 60% dos isolados de amostras clínicas. A lesão ocasionada pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Esta espécie é sem dúvida alguma a espécie mais frequente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Trata-se de levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (COLOMBO, 2003).

3.3 Agentes antifúngicos

De acordo com Rang & Dale (2011), o fluconazol, cetoconazol e itraconazol são azóis que inibem a enzima fúngica 3α do citocromo P450, lanosina 14α -desmetilase, que é

responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, principal esteroide da membrana celular fúngica. A depleção resultante de ergosterol altera a fluidez da membrana e isso interfere na ação das suas enzimas, inibindo a sua replicação.

Por outro lado, o antibiótico antifúngico anfotericina B, padrão-ouro para o tratamento das infecções fúngicas causadas por *Candida*, tem ação nas membranas celulares fúngicas, onde ela interfere na permeabilidade e nas funções de transporte. Sua propriedade mais importante é provavelmente sua capacidade de formar grandes poros na membrana. O centro hidrofílico da molécula cria um canal iônico transmembrana, causando alterações graves no equilíbrio iônico, incluindo perda de K^+ intracelular. E a nistatina, que é um antibiótico com estrutura similar à da anfotericina e com o mesmo mecanismo de ação. Porém de uso limitado às infecções por *Candida* na pele, membranas mucosas e trato gastrointestinal (RANG & DALE, 2011).

3.4 Naftoquinonas

As quinonas naturais e sintéticas são substâncias reconhecidamente possuidoras de potentes e variados tipos de atividades biológicas como antitumorais, moluscicidas, leishmanicidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, tripanocidas e antiprotozoárias. (ALVES, 2008). Sendo o lapachol e a β -lapachona consideradas as naftoquinonas que mais influenciaram atualmente nas pesquisas em química e farmacologia de quinonas (CRUZ, 2012).

Ferreira (2010) aponta que a β -lapachona foi preparada pela primeira vez, em 1892, a partir do lapachol por Hooker e que desde então os protocolos comumente utilizados para a síntese da β -lapachona são baseados na ciclização catalisada por ácido do lapachol, o qual é obtido do cerne das árvores conhecidas como Lapacho (ipê roxo), ou sintetizado a partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona).

Nos últimos anos o interesse pelas naftoquinonas é crescente, uma vez que são amplamente encontradas e natureza, por possuírem variadas atividades biológicas e não apresentaram atividade hemolítica ou efeito citotóxico. Dentre as quais, destacamos a atividade antifúngica de compostos obtidos por semissíntese a partir de lausona na presença de olefinas contra espécies de *Candida*, inclusive *C. albicans* (FERREIRA et. al, 2010; FREIRE et al., 2010).

Diante desse fato, a busca por novos agentes antifúngicos mais ativos, com menos efeitos colaterais e menos efeitos tóxicos tem sido de grande importância no tratamento das infecções fúngicas. (FERREIRA et. al., 2010).

Freire et. al. (2010) descreveram a síntese e a potente atividade antifúngica de algumas naftoquinonas, dentre elas a IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) frente a seis espécies de *Candida* sendo que o composto mais ativo obteve CIM (concentração inibitória mínima) de 0.54 μ M, uma concentração inferior a dos medicamentos disponíveis no mercado. Deve-se acrescentar ainda que, essas naftoquinonas não apresentaram atividade hemolítica ou efeito citotóxico.

Faz-se necessário estudar in vitro o possível mecanismo de ação desse novo provável agente antifúngico denominado IVS320 com a finalidade de analisar os possíveis alvos de ação da naftoquinona, se age direta ou indiretamente no envelope celular (parede ou membrana plasmática) do fungo, ou seja, particularmente na biossíntese do ergosterol, o esterol principal constituinte da membrana fúngica.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

Estudo experimental que teve como objetivo investigar o possível mecanismo de ação de uma nova naftoquinona semissintética com atividade antifúngica.

4.2 Universo de estudo

4.2.1 1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione

A naftoquinona que estudada no presente trabalho é identificada como IVS320, foi sintetizada por metodologia própria, pelo grupo de pesquisa do Doutor Vitor Francisco Ferreira do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense – UFF, a partir da lausona, isoladas e caracterizadas por métodos cromatográficos e espectroscópicos.

4.2.2 Drogas padrão

Os antifúngicos cetoconazol, e anfotericina B (Sigma) foram diluídos conforme especificado no protocolo M27-A2 do CLSI, 2002. O cetoconazol e fluconazol foram diluídos em água estéril e a anfotericina B foi dissolvida em DMSO para preparo das soluções estoque 2mg/mL. Após as diluições, obtivemos as concentrações finais de 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 μ L/mL em meio de cultura RPMI 1640.

4.2.3 Cepa padrão

Foi testada a cepa ATCC (American Type Culture Collection) 36232 de *Candida albicans* pertencente a coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.2.4 Preparação do inóculo

Primeiramente, foi realizado repique da cultura de *Candida albicans* em tubos estéreis com ágar Sabouraud Dextrose na qual a temperatura de incubação permaneceu em 35°C. O inóculo foi preparado escolhendo 5 colônias com diâmetro de aproximadamente 1mm de cultura de 48h, estas foram suspensas em 5mL de solução estéril 0,15mol/L (salina a 0,85%). A suspensão resultante foi homogeneizada e com o auxílio de uma pipeta foi retirado uma pequena quantidade a acrescentado na câmara de Neubauer para a realização da contagem celular e cálculos com a finalidade de obter uma suspensão-padrão de levedura contendo

1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Foi realizado uma diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640 que resultou em concentração de $2,5 \times 10^3$ células/mL².

4.2.5 Preparo dos antifúngicos:

4.2.5.1 Para ensaio sorbitol:

Anfotericina: 64µL da solução 2mg/mL de anfotericina avolumado com 1936 mL de meio RPMI mais sorbitol; Cetoconazol: 64µL da solução 2mg/mL de cetoconazol avolumado com 1936 mL de meio RPMI mais sorbitol; IVS 320: 200µL da solução 2mg/mL de IVS 320 avolumado com 1800 mL de meio RPMI mais sorbitol.

4.2.5.2 Para ensaio ergosterol:

Anfotericina: 64µL da solução 2mg/mL de anfotericina e adicionado 1936 mL de meio RPMI.

4.3 Ensaios:

4.3.1 Ensaio sorbitol

Com objetivo de avaliar a interferência das naftoquinonas na formação da parede celular fúngica foi realizado o ensaio descrito por Silva Junior et. al. (2010). Foi verificada a influência do sorbitol, que é um osmoprotetor, no crescimento do fungo *Candida albicans* ATCC 36232. A CIM das naftoquinona contra *Candida albicans* ATCC 36232 foi determinada por método de microdiluição em caldo (CLSI M27-A2), o Sorbitol foi adicionado ao meio de cultura para dar uma concentração final de 0,8 M. Após a incubação a 25 ° C, as placas foram lidas em 48h (Frost et al., 1995).

4.3.2 Efeito do ergosterol na CIM da naftoquinona

Com o objetivo de avaliar a ação da naftoquinona na síntese do ergosterol foi utilizado o ensaio descrito por Silva Junior et. al. (2010). A CIM das naftoquinona contra *Candida albicans* ATCC 36232 foi determinada por método de microdiluição em caldo (CLSI

M27-A2), com e sem a adição de ergosterol (Sigma), as concentrações de 200, 400 e 800 µg/mL foram avaliadas. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.3 Mensuração do efluxo de potássio intracelular

Com o objetivo de avaliar a ação das naftoquinona nas trocas iônicas celulares foi utilizado o ensaio descrito por Hao et al (2009). O ensaio foi realizado com o fungo *Candida albicans* ATCC 36232, na CIM que a naftoquinona apresentou atividade. O efluxo de K⁺ foi mensurado usando a técnica de eletrodo íon-seletivo (OMNI-C analyzer, ROCHE). Resumidamente, o microrganismo foi cultivado overnight (35 °C), as células foram lavadas e ressuspendidas a concentração de 1×10^7 células/mL em tampão fosfato de sódio (pH 7.2). Um mililitro da suspensão de fungos foi incubado com a naftoquinona por diferentes tempos, A quantidade de K⁺ liberado foi mensurada e comparada com a cultura controle (ausência da naftoquinona). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.4 Mensuração do extravasamento de nucleotídeos

Foi investigada a capacidade da naftoquinona de causar extravasamento extracelular de nucleotídeos como descrito por Tang et al (2008). Foi utilizada uma cultura na fase logarítmica do crescimento do fungo *Candida albicans* ATCC 36232. As células obtidas (1×10^7) foram lavadas e ressuspendidas em tampão PBS (10 mM, pH 7.4). Estas foram incubadas com a naftoquinona na concentração da CIM por diferentes tempos. Um experimento contendo o fungo incubado com salina (PBS) foi usado como controle. Após centrifugação, foi quantificada a absorvidade do sobrenadante da cultura no comprimento de onda de 260 nm (SPECTRONIC, GENESYS 5, MILTON ROY).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Vários ensaios foram realizados com a finalidade de avaliar a ação antifúngica da naftoquinona semissintética (IVS 320) frente a *Candida albicans* ATCC 36232.

5.1 Ensaio Sorbitol

O ensaio do sorbitol é baseado na extensão e capacidade dos danos que uma determinada substância possa causar aos componentes da parede celular fúngica, e provocar lise das células na ausência do sorbitol, que funciona como um osmoprotetor (FROST, et al 1995). Se o produto age de alguma forma sobre a parede celular fúngica, irá causar a lise de suas células, quando na ausência de um estabilizador osmótico. Assim, este teste compara a CIM de produtos antifúngicos, na ausência e presença de 0,8M de sorbitol, um protetor osmótico utilizado para estabilizar os protoplastos de fungos (PEREIRA, 2009).

A concentração inibitória mínima (CIM) da IVS320 frente a *Candida albicans* ATCC 36232, foi avaliada na presença e ausência de sorbitol 0,8M. Se na presença de sorbitol, um osmoprotetor, a CIM da droga é aumentada, indica-se que a droga pode estar agindo na parede do fungo (FROST et al., 1995).

A CIM da naftoquinona (IVS 320) obtida na ausência do sorbitol foi de 50ug/ml e na presença foi também de 50ug/ml após 72 horas de incubação, o que sugere que IVS320 não atua através da inibição dos mecanismos que controlam a síntese ou a existência da parede celular fúngica.

5.2 Ensaio Ergosterol

Este ensaio teve como objetivo avaliar a ação da IVS320 na síntese do ergosterol. Essa avaliação é importante, pois as maiorias dos fármacos antifúngicos atuam sobre a membrana plasmática da célula fúngica e interfere em grande parte das vezes no metabolismo do ergosterol. Como exemplo, temos os azóis, agentes antifúngicos sintéticos que inibem o sistema enzimático dependente do citocromo P450, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol – principal esterol na membrana fúngica (RANG & DALE, 2011).

Entende-se que a redução de ergosterol altera a fluidez da membrana, logo o aumento nos valores de CIM na presença de ergosterol indica interferência.

Foi possível identificar que a IVS230 não interage com o ergosterol da membrana frente às células de *C. albicans* ATCC 36232, permanecendo inalterada em diferentes concentrações (200 a 800µg/mL) de ergosterol exógeno. Somente a droga-padrão anfotericina B, que possui grande especificidade pelo ergosterol, apresentou um aumento de 4x da CIM.

A realização deste ensaio foi importante, pois as maiorias dos fármacos antifúngicos atuam sobre a membrana plasmática celular fúngica que interfere no metabolismo do ergosterol.

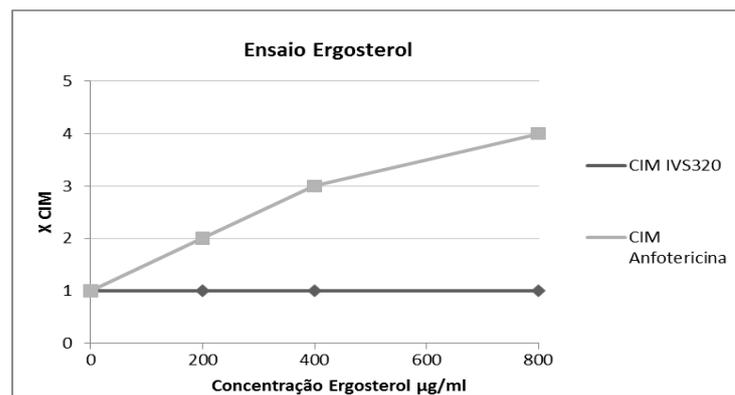


Figura 4. Efeito do ergosterol exógeno (200 a 800µg/mL) sobre a CIM de IVS320 e anfotericina B frente a *Candida albicans* ATCC 36232. A CIM IVS320 permaneceu inalterada.

Logo, este resultado sugere que esta naftoquinona semissintética não apresenta possível mecanismo de ação na membrana celular fúngica relacionado ao ergosterol.

5. 3 Ação sobre o efluxo de potássio

Este ensaio teve como objetivo de avaliar a ação da IVS320 nas trocas iônicas das células fúngicas de *Candida albicans* ATCC 36232. Foi possível investigar o efeito de efluxo de potássio perante a membrana celular, a qual é responsável pelo controle osmótico e manutenção da concentração diferencial de íons, como o K^+ intracelular.

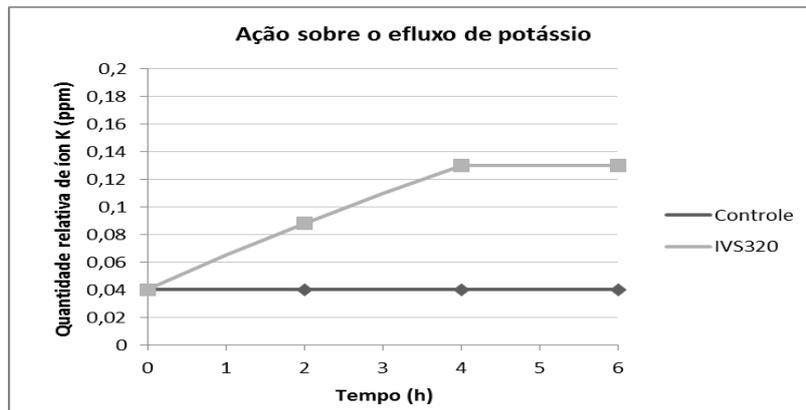


Figura 5: Ação da IVS320 sobre o efluxo de K^+ frente a *C. albicans* ATCC 36232.

Os resultados demonstraram que houve efluxo de K^+ das células de *Candida albicans* ATCC 36232 para o meio extracelular com a presença da naftoquinona. O gráfico indica que não ocorreram alterações na concentração extracelular de K^+ da cultura controle, pois esta se manteve constante durante a incubação. A relação da quantidade relativa de íons K^+ e a duração da incubação indicou a permeabilidade da membrana fúngica, processo fundamental para a manutenção intracelular da célula, que aumentou até 4h.

5.4 Extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar se a IVS320 age na membrana celular. Verificou-se se esta naftoquinona tem a capacidade de causar extravasamento extracelular de ácidos nucleicos, quantificados do sobrenadante da cultura no comprimento de onda de 260 nm, espectro de absorbância máxima de nucleotídeos. Caso ocorra a ruptura da estabilidade da membrana fúngica, as substâncias da célula são extravasados do meio intracelular para o extracelular.

A IVS320 (1xCIM e 4xCIM) adicionada a suspensões de *Candida albicans* ATCC 36232, foram analisadas em intervalos de tempo de 1, 2, 4 e 6h. A figura mostra a relação da naftoquinona ao ácido perclórico, que produz 100% de extravasamento celular.

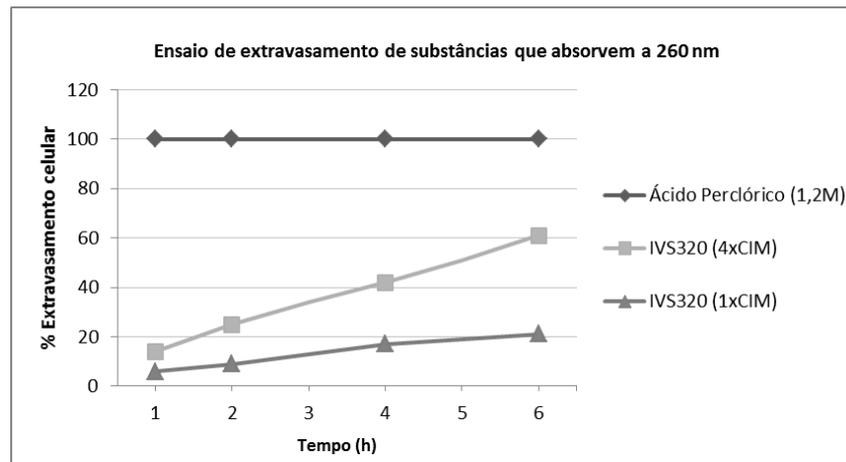


Figura 6: Ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm frente a *C. albicans* ATCC 36232.

A 1xCIM da IVS320 causou aumentos de 6, 9, 17 e 21%, já a 4xCIM causou um aumento de 2,6x no extravasamento de nucleotídeos, com 14, 25, 42 e 61% em tempos de 1, 2, 4 e 6h respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que a IVS230 age na membrana celular do fungo.

6. CONCLUSÃO

A naftoquinona semissintética, denominada IV320, não afetou a parede celular de *Candida albicans*, porém demonstrou através dos ensaios de efluxo de K^+ e extravasamento de nucleotídeos causarem alterações na atividade da membrana celular, sem relação de interação com o ergosterol.

REFERÊNCIAS

- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. BG., 2010. DST - Jornal brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis, 2010: 22(1): 22-38.
- CAVASSANI, Valdinês Gonçalves dos Santos et al . Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV. Rev. Bras. Otorrinolaringol., São Paulo , v. 68, n. 5, out. 2002.
- COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARAES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 36, n. 5, Oct. 2003.
- CRUZ, A. Noeli et al. Extração e conversão química de uma quinona natural e aplicação do produto em química de coordenação, 2012. Periódicos – UEMS, Brasil.
- FERREIRA, V. F., et al., Strategies for synthesis of bioactive pyran naphthoquinones. Organic & Biomolecular Chemistry, v. 8, p. 4793-4802, 2010.
- FREIRE et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β - 2,3- dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. Med .Chem. Commun., v. 1, p. 229-232, 2010.
- FROST D. J., et. al. A whole-cell *Candida albicans* assay for detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. J. Antibiot, v. 48, p. 306-310, 1995.
- GARNACHO-MONTERO, J. et al. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. Antimicrobial agents and chemotherapy, Washington, v. 54, n. 8, p. 3149-3154, Aug. 2010.
- HAO, G.; Shi, Y-H.; Tang, Y-L.; Le, G-W.: The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. Peptides. 2009, 30, 1421-1427.
- KATHIRAVAN, Muthu K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 20, n. 19, p 5678 – 5698, 2012.
- LEÃO RIBEIRO, E. et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. NewsLab, v. 64, n. 3, p. 106-28, 2004.
- LEE, J., Hwang, J. S., Hwang, I. S., Cho, J., Lee, E., Kim, Y., et al. (2012). Coprisin-induced antifungal effects in *Candida albicans* correlate with apoptotic mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.*
- LEITE, C. L. et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. Biotemas, v. 19, n. 2, p.
- MAFFEI, M. L. Cláudia. Agentes Antifúngicos, 2007. Profa. Dra. Claudia M. L. Maffei (FMRP-USP) Disponível em: <http://biocelfmrp.com.br/sites/default/files/antifungicos_0.pdf> Acesso em: Jun 2014.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. J. bras. pneumol., São Paulo, v. 32, n. 5, Oct. 2006.

MURRAY, Patrick R. Microbiologia médica - 5ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada- Segunda Edição. NCCLS norma M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton*. João Pessoa: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 2009. 33.

RANG, H.P.; DALE, M.M.: FARMACOLOGIA, Ed. Guanabara Koogan AS. 7ª edição, pp. 649 - 653, 2011.

SANTOS, A. R.; Carvalho, H. F. 2001. 4. Biomembranas. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). A Célula 2001. Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56.

SHARON CAC, Sorrell TC 2007. Antifungal agents. MJA 187: 404-409.

SILVA JUNIOR, I. F., et al. . Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid, Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, p. 422-428, 2010.

SILVA V.; M CRISTINA DÍAZ J.; NALDY FEBRÉ Y. Red De Diagnóstico En Micología Médica. Vigilancia De La Resistencia De Leveduras A Antifúngicos. Rev. Chil. Infectol. Santiago v.19 Supl.2 2002.

TANG, Y. L., Shi, Y. H., Zhao, W., Hao, G., & Le, G. W.: Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2008, 48: 1187-1194.

YUNES RA, CALIXTO JB, 2001. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 500p.

CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2013					2014						
	Atualização bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Ensaio preliminares do mecanismo de ação antifúngica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	Análise dos resultados			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	Elaboração do Resumo e Relatório Final						X	X	X	X	X	X	X
	Preparação da Apresentação Final para o Congresso										X	X	X