

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



DISSERTAÇÃO

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E CITOTÓXICO DE ÁCIDOS GRAXOS E OXIMAS

JULIANA LEITZKE SANTOS DE SOUZA

Pelotas, 2013

JULIANA LEITZKE SANTOS DE SOUZA

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E CITOTÓXICO DE ÁCIDOS GRAXOS E OXIMAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S729p Souza, Juliana Leitzke Santos de
Potencial antifúngico e citotóxico de ácidos graxos e oximas /
Juliana Leitzke Santos de Souza; orientador Rafael Guerra Lund;
co-orientador Claudio Martin Pereira de Pereira. – Pelotas, 2013.
94f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção. Centro de Ciências Químicas,
Farmacêuticas e de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas.
Pelotas, 2013.

1.Ácidos graxos 2.Oximas 3.Atividade antifúngica
4.*Candida* 5.Produção de exoenzimas 6.Citotoxicidade
I. Lund, Rafael Guerra (orientador) II .Título.

CDD 547.437

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada **Potencial antifúngico e citotóxico de ácidos graxos e oximas**, de autoria de Juliana Leitzke Santos de Souza.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund - Orientador – Faculdade de Odontologia – UFPel

Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff - Faculdade de Veterinária – UFPel

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Alves Rodrigues - CNPq/UFRGS

Prof. Dr^a. Patricia Nascente - Suplente – Instituto de Biologia – UFPel

DEDICATÓRIA

**A razão da minha vida: minha
mãe Lia, meu marido Leonardo
e a minha filha Júlia, com todo
meu amor e carinho.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força que me fez seguir firme nesta árdua, porém muito promissora caminhada, repleta de momentos inesquecíveis. Pela sabedoria destinada a mim, por me ensinar, que Ele sempre sabe o momento certo de interceder em nossas vidas e por ter me abençoado com mais esta conquista.

À minha família pelo incentivo, compreensão e carinho durante esta trajetória de dois anos na pós-graduação, apoiando-me de todas as maneiras possíveis. Aguentando minha ansiedade em todas as grandes etapas que o mestrado possui minha choradeira nos momentos de desespero e minha tagarelice nos momentos de empolgação.

Obrigada mãe, por tudo que você me deu e me ensinou. Obrigada pela sua generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. Não encontro palavras que consigam te agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Muito obrigada.

Ao meu marido, meu sincero agradecimento pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis, disponibilidade e paciência ao longo deste período e compreensão pelos momentos em que deixei de estar com ele para conseguir finalizar esse projeto.

À minha filha, por todos os momentos em que deixei de brincar, de estar junto e de cuidar dela, e mesmo assim me ofereceu o amor mais puro em todos os momentos. Filha você me ensina a cada dia como ser uma pessoa melhor.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, mas principalmente a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente ao Pedro, que me ensinou a fazer as metodologias, os meios de cultura, a tabulação dos resultados, que esteve do meu lado do início ao fim desta etapa, com a mesma dedicação e profissionalismo.

À querida funcionária do Laboratório de Microbiologia, Carmem, que com sua simpatia e atenção, sempre esteve à disposição para me ajudar em todos momentos, ainda por lavar minhas placas de vidro, e esterilizar todos meus materiais, sem dúvida se tornou uma amiga para mim.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Guerra Lund, pela liberdade e confiança referente ao presente trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas e seus professores por toda dedicação no processo constante de melhoria do Programa e por me fazer ter certeza que fiz a escolha certa.

Também a CAPES pela bolsa auxílio concedida de grande ajuda para que pudesse me dedicar exclusivamente aos estudos e a elaboração da dissertação durante parte do Mestrado.

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.”

Martin Luther King

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estruturas em Artigos, que consta do Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf)

RESUMO

SOUZA, Juliana Leitzke Santos. **Potencial antifúngico e citotóxico de ácidos graxos e oximas**. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A secreção de fosfolipases e proteinases extracelulares de *Candida* têm sido descrito como um fator de virulência relevante em infecções humanas. Ácidos graxos alifáticos possuem conhecida propriedade antimicrobiana, mas o modo pelo qual atuam nos fatores de virulência em microrganismos, como *Candida*, nem sempre é claro. As oximas têm uma longa história em síntese orgânica e na química medicinal. Entretanto, há poucos relatos sobre a sua toxicidade. Assim, este estudo investigou *in vitro* a atividade antifúngica, a capacidade de inibição da produção de exoenzimas e a citotoxicidade de alguns ácidos graxos, seus derivados ésteres metílicos e etílicos e de dez compostos da classe das oximas contra espécies de *Candida*. O MIC e o MFC foram realizados usando o método NCCLS M27-A3. Foi também investigado a influência destes compostos na inibição da produção de enzimas hidrolíticas, fosfolipase e proteinase, produzidas por *Candida*. O ácido graxo que apresentou o melhor resultado em MIC contra espécies de *Candida* foi o ácido láurico, os ésteres derivados não apresentaram atividade. Para os ácidos graxos, a inibição da enzima fosfolipase foi mais significativa do que a produção de proteinase. Já as oximas apresentaram uma ótima capacidade de inibição da expressão de fosfolipase com a redução de 50% na maioria dos casos. No entanto, não alteraram significativamente a expressão de proteinases. Os resultados mostram uma grande redução na produção de fosfolipase, que sugere que ambas as classes de compostos testados podem interferir na invasão do hospedeiro e na evolução da doença. Os ácidos graxos mostraram viabilidade celular maiores que 80% nas concentrações de MIC, bem como em concentrações de efeito antienzimática. Portanto, a utilização potencial de ácidos graxos e oximas, podem ser consideradas em futuros estudos, para o tratamento de candidíase.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Oximas. Atividade antifúngica. *Candida*. Produção de exoenzimas. Citotoxicidade.

ABSTRACT

SOUZA, Juliana Leitzke Santos. **Potencial antifúngico e citotóxico de ácidos graxos e oximas**. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The secretion of extracellular phospholipases and proteinases of *Candida* has been described as a relevant virulence factor of human infections. Aliphatic fatty acids have antimicrobial properties, but the mode by which they act in the virulence factors of microorganisms, such as *Candida*, is still unclear. The oximes have a long history in organic synthesis and medicinal chemistry. Moreover, there are few reports about their toxicity. Current study investigated the *in vitro* antifungal activity, exoenzyme production and cytotoxicity of some aliphatic fatty acids and their esters derivatives and ten oximes against the *Candida* species. The MIC and MFC of aliphatic medium-chain fatty acids, methyl and ethyl esters and oximes were performed by the CLSI M27-A3 method. The influence of these compounds in the inhibition of the production of hydrolytic enzymes, phospholipase and proteinase by *Candida* was also investigated. Lauric acid was the fatty acid with the best result on MIC against *Candida* species although its esters derivatives showed no activity. The inhibition of phospholipase was more significant than proteinase production by *Candida*. Oximes showed a great ability to inhibit phospholipase with 50% reduction in most cases. However, tested compounds for proteinase did not affect the enzyme. Current results showed a great reduction in phospholipase production which suggests that compounds of this class may interfere with the invasion of the host and disease growth. The fatty acids showed 80% cell viability in MIC concentrations, as in the concentrations which presented anti-enzymatic effect. Therefore, the potential use of these fatty acids and oximes could be the base for more antimicrobial tests.

Keywords: Fatty acids. Oximes. Antifungal activity. *Candida*. Exoenzymes production. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Diferentes alvos para a terapia antifúngica.....	19
Figura 2 - Estrutura geral de um ácido graxo.....	30
Figura 3 - Reação de esterificação do ácido carboxílico.....	33
Figura 4 - Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Bronsted.....	33
Figura 5 - Síntese de oximas a partir de diferentes benzaldeídos substituídos.....	34
ARTIGO 2	
Figure 1 - Effect of different types and concentrations of Oximes following exposure for 48 h on the inhibition of NIH/3T3 cell line.....	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Nomenclatura de ácidos graxos saturados que ocorrem em óleos e gorduras.....	31
 ARTIGO 1	
Table 1 - The general structure of each compound tested against <i>Candida</i> species.....	50
Table 2 - Screening of fatty acids and esters against strains of <i>Candida</i> spp.....	51
Table 3 - Comparison between Pz results of tests, control and inhibition ratio results in percentage for Phospholipase and Proteinase production.....	52
Table 4 - Cell survival percentage for L-929 mouse fibroblasts exposed to tested agents.....	53
 ARTIGO 2	
Table 1 - The chemical structure of each compound tested against the species <i>Candida</i> and synthesis yield.....	73
Table 2 - Screening of oximes against strains of <i>Candida albicans</i> and non- <i>albicans Candida</i>	74
Table 3 - Comparison between Pz results of tests, control and inhibition ratio results in percentage for Phospholipase production.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	(Enzyme Commission Numbers) - Classificação das Enzimas
FFAs	(<i>Free Fatty Acids</i>) - Ácidos Graxos Livres
HIV	(<i>Human Immunodeficiency Virus</i>) - Vírus da Imunodeficiência Humana
ISO	(<i>International Standard Organization</i>) – Organização Internacional de Padronização
Liso-PL	<i>Liso-Phospho Lipases</i> - Liso-fosfolipases
PLA1	<i>PhosphoLipase A</i> (EC. 3.1.1.32) - Fosfolipase A
PLA2	<i>PhosphoLipase A2</i> (EC. 3.1.1.4) - Fosfolipase A2
PLC	<i>PhosphoLipase C</i> (EC. 3.1.4.3) - Fosfolipase C
PLD	<i>PhosphoLipase D</i> (EC. 3.1.4.4) - Fosfolipase D
Saps	(<i>Secreted Aspartil Proteinases</i>) - Aspartil- proteinases secretadas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Desenvolvimento de fármacos.....	19
3.2 <i>Candida spp</i>	20
3.3 Fatores de Virulência.....	22
3.3.1 Enzimas Extracelulares.....	23
3.3.1.1 Proteinase.....	24
3.3.1.2 Fosfolipase.....	26
3.4 Inibição de Fatores de Virulência.....	27
3.5 Avaliação da Citotoxicidade.....	28
3.6 Candidatos a Fármacos.....	30

3.6.1 Ácidos Graxos.....	30
3.6.2 Ésteres.....	32
3.6.3 Oximas.....	34
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	36
4.1 Artigo 1.....	36
4.2 Artigo 2.....	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
6 REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO 1.....	85
ANEXO 2.....	91
ANEXO 3.....	92
ANEXO 4.....	93
ANEXO 5.....	94

1 INTRODUÇÃO

Enormes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, a fim de suprir a emergência de organismos que são resistentes a agentes quimioterápicos atuais e desenvolver novos compostos químicos que contornam os mecanismos de resistência a drogas existentes. Assim, a busca por novas moléculas pode proporcionar compostos químicos úteis para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com baixa toxicidade (LU & TONGUE, 2008).

As propriedades antimicrobianas de alguns ácidos graxos livres são bem conhecidas e, devido atuarem por diferentes mecanismos quando comparados a maioria dos antibióticos convencionais, oferecem um potencial à exploração comercial (DESBOIS & SMITH, 2010). Ésteres de ácidos graxos e derivados são usados em uma vasta gama de produtos como, por exemplo, em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica, devido a serem biodegradáveis e a baixa toxicidade (HOBUSS et al., 2012). As oximas têm uma longa história em síntese orgânica e na química medicinal. No entanto, há poucos relatos sobre o modo pelo qual eles atuam nos fatores de virulência de *Candida* e sua citotoxicidade (BERGSSON et al., 2001; HUANG et al., 2010; HUANG et al., 2011).

Candida spp. são fungos comensais comumente encontrados na cavidade oral, no tubo digestivo, na orofaringe, na vagina e na pele de indivíduos saudáveis (DUVAL et al., 2011), podem tornar-se patogênicos quando mecanismos naturais de defesa são prejudicados. *Candida albicans* é a espécie mais comumente associada à infecção, embora possa ocorrer por outras espécies de *Candida*, como as não-*albicans* (LACAZ et al., 2002). Fatores como terapia antibacteriana, violação da pele ou mucosas, cirurgia abdominal, diabetes mellitus, gravidez, neutropenia e a Imunodeficiência Adquirida (HIV) predispõe a candidíase (TRABULSI et al., 2005).

Espécies de *Candida* desenvolvem mecanismos específicos que conferem a capacidade de colonizar células hospedeiras epiteliais, influenciando as defesas do hospedeiro para invadir as células mais profundas (KADIR et al., 2007). A capacidade de espécies de *Candida* em persistir e causar a infecção no hospedeiro tem sido atribuída aos seus fatores de virulência, os quais incluem: adesão, dimorfismo, a capacidade de alternar entre diferentes tipos morfológicos,

interferência com o sistema imune, sinergismo, e a produção de enzimas extracelulares tais como proteinase e fosfolipase (WILLIS et al., 2001; FONZI, 2009).

Um dos fatores mais importantes de virulência de *Candida* são proteinases e fosfolipases extracelulares (BARROS et al., 2008). As proteinases aspárticas secretadas são responsáveis pelos danos dos tecidos, adesão e evasão de respostas imune do hospedeiro. A sua atividade proteolítica tem sido associada com a invasão de tecidos (HUBE & NAGLIK, 2001), sendo que a secreção de fosfolipases extras celulares é considerada uma função fundamental, que auxilia a invasão dos epitélios da mucosa do hospedeiro. As fosfolipases, de um modo geral, catalisam a hidrólise de fosfolipídios, que são os principais componentes de todas as membranas celulares (IBRAHIM et al., 1995).

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos ou antiproliferativos da amostra-teste em culturas celulares. São de extrema importância durante o desenvolvimento de produtos (químicos, farmacêuticos, alimentícios, biológicos e físicos) destinados ao uso humano ou em animais (WEYERMANN et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a atividade anti-*Candida in vitro* e citotoxicidade dos ácidos graxos de cadeia média, ésteres derivados e compostos da classe das oximas frente à espécies de *Candida*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar a CIM e CFM dos ácidos graxos de cadeia média, metil e etil ésteres derivados e de dez compostos da classe das oximas;
- 2) Avaliar a influência desses compostos contra fatores de virulência de *Candida albicans*, como inibição da produção de fosfolipase e proteinase;
- 3) Avaliar a citotoxicidade desses compostos frente à linhagem de células de origem mesenquimal (fibroblastos 3T3/NIH e L-929).

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas duas décadas têm ocorrido mudanças no padrão de doenças fúngicas sistêmicas em seres humanos. Estas infecções têm assumido uma importância muito maior do que no passado, em grande parte como resultado de grandes avanços no cuidado da saúde que tornaram possível o suporte a transplantados, pacientes de tratamento intensivo, e outros indivíduos imunossuprimidos, por períodos mais longos de tempo. Nos países desenvolvidos, mudanças nos padrões demográficos, em particular uma população com maior número de idosos e incidência de doenças crônicas e debilitantes, também resultaram em um aumento no tamanho da população de risco para infecções fúngicas (DISMUKES et al., 2003).

Espécies de *Candida* têm progredido de patógenos raros amplamente consideradas contaminantes para humanos a importantes e comuns agentes patogênicos que causam uma grande variedade de doenças superficiais e profundas.

3.1 Fármacos antifúngicos

O arsenal terapêutico antifúngico tem aumentado muito, nestes últimos anos, buscando atender a uma demanda crescente na micologia médica. Na verdade, a partir da década de 1980, alguns fatores, como incremento nos métodos de diagnóstico, aumento nas septicemias por leveduras, uso de procedimentos terapêuticos e/ou cirúrgicos invasivos, e, até mesmo, o surgimento de novas doenças imunossupressoras, como o HIV, por exemplo, tem pressionado a indústria química-farmacêutica no sentido de buscar novas alternativas de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os fármacos antifúngicos surgiram bem mais tarde do que os agentes antibacterianos, em decorrência de serem os fungos, a exemplo do hospedeiro, agentes eucarióticos. Assim, em razão desta similaridade celular, muitas substâncias com propriedades antifúngicas causam ações deletérias inespecíficas, podendo acarretar uma série de efeitos colaterais ao paciente, sendo esse, portanto, um dos fatores que retardam o surgimento destes fármacos, bem como continuam limitando os avanços no campo da terapia antifúngica. Entretanto, um empenho considerável

vem sendo direcionado em busca de agentes antimicóticos mais específicos e, por conseguinte, com uma maior margem de segurança para o hospedeiro (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Diferentes tipos de mecanismos contribuem para o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos. Os fármacos antifúngicos clinicamente utilizados atuam em uma ou mais, das oito rotas metabólicas dos fungos, tais como a síntese de ergosterol, síntese de quitina, síntese de ergosterol, síntese de glucana, epoxidase do esqualeno, síntese de ácido nucleico, síntese de proteínas e a síntese de microtúbulos (KATRIVARAM et al., 2012). Diferentes alvos para a terapia antifúngica são demonstrados na Figura1.

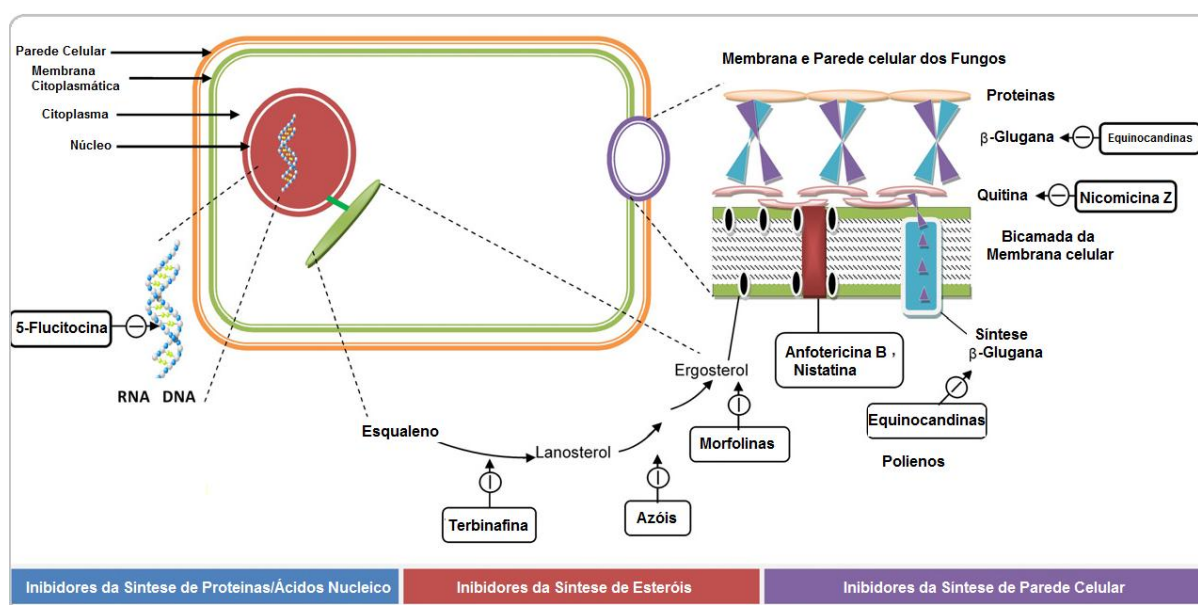


Figura1. Diferentes alvos para a terapia antifúngica (KATRIVARAM et al., 2012).

Entre as cinco espécies mais comuns de *Candida* spp. causadoras de candidíase, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* permanecem suscetíveis aos polienos, a flucitocina, aos azóis e as equinocandinas. *C. glabrata* é inerentemente ou dose-dependente suscetível e/ou resistente ao fluconazol. *C. krusei* é conhecida por apresentar resistência intrínseca ao fluconazol, e diminuída susceptibilidade a anfotericina B. Triazóis novos, como voriconazol e posaconazol, e as equinocandinas são ativos contra estas duas espécies, embora exista resistência cruzada aos azóis por algumas cepas de *Candida glabrata* (KATRIVARAM et al., 2012).

3.2 *Candida* spp.

Candida são fungos pequenos (4–6 µm), ovais, leveduriformes, de parede fina, que se reproduzem por brotamento ou fissão. O gênero *Candida* é composto por mais de 200 espécies e constitui uma espécie de levedura extremamente diversa (TRABULSI et al., 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004; THOMAS et al., 2003; DISMUKES et al., 2003; LACAZ et al., 2002). Apenas algumas espécies causam doença em humanos. Sendo que as espécies de clinicamente significativa incluem: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. stellatoidea* e *C. dubliniensis* (DISMUKES et al., 2003).

Estes microrganismos crescem facilmente em cultura sólida ou líquida em Ágar. Na maioria das situações, não necessitam de condições especiais de crescimento. No meio de cultura, espécies de *Candida* formam colônias lisas, brancas, cremosas e brilhantes (DISMUKES et al., 2003). As numerosas espécies de *Candida* são facilmente identificadas com base em características de crescimento e em kits comerciais que avaliam a assimilação de carboidratos e reações de fermentação e fornecem identificação das espécies dentro de 2-4 dias. A identificação rápida, mas não específica de *C. albicans* pode ser feita por meio de testes para a produção de tubo germinativo. Este teste é realizado através do crescimento da levedura em soro a 37 °C e observando-se o crescimento das pequenas projeções da parede celular que se desenvolvem após 60-90 minutos de incubação (TRABULSI et al., 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004; THOMAS et al., 2003; DISMUKES et al., 2003; LACAZ et al., 2002). *C. stellatoidea* e *C. dubliniensis* também apresentam tubos germinais, assim provocando resultados falso-positivos. CHROMagar, é um meio de cultura muito comum utilizado para identificar rapidamente espécies de *Candida* (PFALLER et al., 2001), que emprega uma reação química colorimétrica com Ágar que permite distinção entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, e outras espécies de *Candida* não-*albicans* (DISMUKES et al., 2003).

C. albicans continua a ser o principal patógeno fúngico do homem e a causa mais comum de infecção fúngica da mucosa e sistêmica (TRABULSI et al., 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004; THOMAS et al., 2003; DISMUKES et al., 2003; PFALLER et al., 2001), e é a espécie melhor caracterizada (LACAZ et al., 2002). *C. albicans* é

um fungo dimórfico, que se apresenta sob forma leveduriforme (blastosporângios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Além disso, sob condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode ocorrer à formação de clamidósporos que são esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular. Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos (ÁLVARES et al., 2007; TRABULSI et al., 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004; DISMUKES et al., 2003; LACAZ et al., 2002).

C. glabrata tornou-se importante por causa da sua crescente incidência em todo o mundo e diminuída suscetibilidade aos antifúngicos. Seu surgimento é em grande parte, devido a um aumento da população de pacientes imunocomprometidos e amplo uso de medicamentos antifúngicos (TRABULSI et al., 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004; THOMAS et al., 2003; PFALLER et al., 2001).

C. parapsilosis é a terceira causa mais comum de candidemia a nível mundial (PFALLER et al., 2001), especialmente em pacientes com cateteres intravenosos, dispositivos protéticos e uso de drogas por via intravenosa (TROFA et al., 2008). *C. parapsilosis* é uma das causas mais comuns de candidemia em unidades de terapia intensiva (DISMUKES et al., 2003). Esta espécie produz biofilme como um fator de virulência o que lhe permite aderir a superfícies do ambiente hospitalar e pele de pessoas hospitalizadas.

C. tropicalis é a terceira ou quarta espécie mais comumente recuperada de culturas de sangue (PFALLER et al., 2001). Neutropenia, leucemia prolongada e tempo em internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) são fatores de risco para candidemia por *C. tropicalis* (DISMUKES et al., 2003).

C. krusei é a quinta espécie mais isolada na corrente sanguínea (1 -2%), é de importância clínica devido à sua resistência intrínseca a fluconazol, e sensibilidade reduzida à maior parte dos outros antifúngicos (SIDRIM e ROCHA, 2004; DISMUKES et al., 2003; PFALLER et al., 2001). *C. krusei* é frequentemente recuperada a partir de pacientes com doenças hematológicas malignas, complicada por neutropenia, e tende a ser associada a maiores taxas de mortalidade (49%) quando comparada com *C. albicans* (DISMUKES et al., 2003).

C. guilliermondii é uma espécie rara, as infecções devidas são candidemia, em hospedeiros neutropênicos, e em dependentes químicos, ocasionalmente, são

relatado doença invasiva como é endocardite intravenosa (SIDRIM e ROCHA, 2004; DISMUKES et al., 2003).

C. lusitaniae é de importância clínica devido à intrínseca ou secundária aquisição de resistência à Anfotericina B e encontra-se normalmente em pacientes com neoplasias hematológicas e pacientes em UTI (DISMUKES et al., 2003; THOMAS et al., 2003).

C. stellatoidea está intimamente relacionado com a infecção com *C. albicans*, através da produção de tubos germinativos *in vitro* (DISMUKES et al., 2003).

As infecções humanas por *Candida* spp. estão relacionadas a fatores determinantes, que afetem a microbiota normal, o sistema imune do hospedeiro ou exacerbe a virulências, podendo ser inclusive fisiológicos como a gravidez e suas alterações hormonais ou a idade avançada, entretanto frequentemente está associada a deficiências imunes patológicas como o HIV (LORENZO, 2004; NEVILLE et al., 2004).

O equilíbrio entre a colonização e candidíase depende da capacidade do fungo em modular a expressão de fatores de virulência em resposta às alterações ambientais, combinadas com a competência do sistema imunológico do hospedeiro (MARCOS-ARIAS et al., 2009).

O desequilíbrio imunológico favorece a colonização e invasão tecidual, através dos fatores de virulência do microrganismo, dentre os quais podem ser citados a aderência, a mudança fenotípica e a produção de enzimas extracelulares de degradação tecidual, como proteinase e fosfolipase (CANDIDO et al., 2000).

3.3 Fatores de Virulência

A capacidade de espécies de *Candida* em persistir no hospedeiro e causar a infecção tem sido atribuída às propriedades de virulência (WILLIS et al., 2001; FONZI, 2009). Espécies de *Candida* desenvolvem mecanismos de virulência específicos que conferem a capacidade de colonizar células hospedeiras epiteliais, para invadir as células mais profundas, ou para influenciar as defesas do hospedeiro (KADIR et al., 2007).

Ao longo do tempo algumas espécies de *Candida* vem apresentando resistência a alguns tratamentos de primeira escolha, assim, sendo necessário o desenvolvimento de outros métodos para tratar a infecção (RAMAGE et al., 2012;

KANAFANI & PERFECT, 2008; COWEN, 2008). Uma maneira de fazer isso é interferir nos mecanismos de virulência do fungo, utilizando doses subterapêuticas de drogas, sem a necessidade de matar, inibindo apenas, deixando a cargo das defesas do hospedeiro superar a infecção.

Vários fatores de virulência foram descritos como relevante na patogenicidade de *Candida* spp., incluindo formação de hifas, aderência a tecidos do hospedeiro, comutação fenotípica e produção de enzimas extracelulares. As enzimas hidrolíticas, fosfolipases e proteinases, são capazes de promover a destruição do membranas celulares, as características morfológicas e seu papel no potencial patogênico destes microrganismos são complexas (NAGLIK et al., 2003).

3.3.1 Enzimas Extracelulares: seu papel nos fatores de virulência

Para ajudar na invasão de tecidos do hospedeiro, as células microbianas possuem enzimas hidrolíticas constitutivas e indutíveis, que destroem ou desregulam constituintes de membranas das células hospedeiras, levando a disfunção e/ou ruptura física. Como as membranas são constituídas por lípidos e proteínas, estas substâncias bioquímicas constituem o alvo do ataque enzimático. Fungos patogênicos como por exemplo, *C. albicans*, secretam enzimas que são considerados como sendo parte integrante da sua patogenia, estes são classificados em dois principais tipos, proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e fosfolipases, que hidrolisam os fosfolípidos (GHANNOUM, 2000).

As espécies de *Candida* apresentam uma grande variedade de enzimas que facilitam o desenvolvimento da infecção, como: proteases ácidas, fosfolipases, hialuronidase, condroitina sulfatase, metalo-protease citoplasmática, serina-protease citoplasmática, esterase, glicomilase, fator hemolítico e fosfatase ácida (AZEVEDO et al., 2011; FONZI, 2009).

As proteinases aspárticas secretadas (Saps) são responsáveis pelos danos dos tecidos, adesão e invasão de respostas imune do hospedeiro. A sua atividade proteolítica tem sido associada com a invasão de tecidos (HUBE & NAGLIK, 2001). A secreção de fosfolipases extras celulares é considerada uma função fundamental, que auxilia a invasão dos epitélios da mucosa do hospedeiro. As fosfolipases, de um modo geral, catalisam a hidrólise de fosfolípidos, os quais são componentes principais de todas as membranas celulares (IBRAHIM et al. 1995).

3.3.1.1 Proteinase

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Estas endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina, cisteína, aspártico-proteinases e metaloproteinases (RAO, 1998).

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. Proteínas são degradadas por microrganismos, que utilizam os produtos de degradação como nutrientes para o seu crescimento. A degradação é iniciada por proteinases (endopeptidases) secretadas pelos microrganismos, seguida de hidrólise posterior por peptidases (exopeptidases) em um sítio extra ou intracelular. Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie (MISHRA, 2007). Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, variando as condições de cultura. As espécies oportunistas *C. albicans* e *C. tropicalis*, de importância médica, causam infecções em pacientes imunocomprometidos por possuírem uma aspártico-proteinase extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência (HUBE & NAGLIK, 2001).

As proteinases da *Candida* são classificadas, dependendo do mecanismo catalítico que usam para clivar peptídeos, sendo assim, classificam-se em proteinases aspartil secretadas (Saps), proteinase serina e metaloproteinases. Essas proteinases podem estar ligadas à parede celular da levedura ou serem secretadas extracelularmente (MISHRA, 2007; NAGLIK et al., 2003; PÄRNÄNEN, 2010).

Atividade proteolítica extracelular já havia sido descoberta em meados dos anos sessenta, mas foi no início dos anos noventa, quando métodos moleculares foram introduzidos na área da microbiologia de *Candida*, que os cientistas começaram a compreender a complexidade genética desse fungo. O gene (SAP1) de codificação de uma proteinase extracelular foi clonado em 1991 e pensou-se ser

o responsável pela proteinase aspartil secretora observada em atividade na *C. albicans*. No entanto, um estudo detalhado do genoma de *C. albicans* nos últimos anos indicou que SAP1 foi apenas a primeira descoberta e revelou que o fungo possui um arsenal de dez genes que codificam proteinases extracelulares (HUBE & NAGLIK, 2001).

O fato de que a família de genes SAP estava presente apenas nas espécies mais patogênicas de *Candida*, como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e estava ausente na levedura não patogênica *Saccharomyces cerevisiae*, apoiou a opinião de que essas proteinases poderiam estar envolvidas na virulência (HUBE & NAGLIK, 2001; NAGLIK et al., 2003).

A presença de uma família de genes SAP na *C. albicans* demonstra claramente o papel do fungo como um sistema proteolítico eficiente e flexível que pode revelar-se vital para o sucesso como patógeno oportunista. Além disso, a produção de Saps é um processo altamente regulado e bem controlado, o que parece ser um fator central em muitos aspectos da virulência de *C. albicans* e é indicativa das múltiplas funções que esta família de genes possui. Incluindo o simples papel de digerir moléculas para a aquisição de nutrientes, a contribuição para sediar a invasão de tecidos para digerir ou destruir membranas celulares do hospedeiro, a degradação de moléculas de superfície para melhorar a adesão e a digestão de células e moléculas do sistema imune do hospedeiro para evitar ou para resistir ao ataque antimicrobiano (HUBE & NAGLIK, 2001).

A relação entre a expressão de proteinases aspartil secretadas (Saps) e invasão está bem estabelecida para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* por evidências bioquímicas, genéticas e imunoquímicas, no entanto, vários estudos estão apontando para uma participação de outras enzimas proteolíticas na patogenicidade dessas leveduras (COSTA et al., 2003).

Devido à existência de vários inibidores naturais das proteases, vários grupos de pesquisa buscam um melhor conhecimento a respeito destas classes de enzimas, o que é estimulado pelo seu evidente potencial como alvo para novas terapias (HUBE, 2000).

3.3.1.2 Fosfolipase

Um dos fatores mais importantes de virulência de *Candida albicans* é a expressão de fosfolipases extracelulares, que degradam componentes de fosfolípidos da membrana da célula hospedeira, conduzindo ao rompimento de células hospedeiras ou alteração das características de superfície que facilitam a adesão e infecção subsequente (KADIR et al., 2007).

O termo "fosfolipases" refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que partilham a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolípidos. Embora todas as fosfolipases tenham os fosfolípidos como substratos alvo, cada enzima tem a capacidade para clivar uma ligação éster específica. Assim, letras A, B, C, e D, são usados para diferenciação entre fosfolipases e para indicar o vínculo específico alvo da molécula de fosfolípido. Por exemplo, a fosfolipase A (PLA1) hidrolisa a ligação de éster do ácido graxo na posição sn-1 da fração de glicerol, enquanto que a fosfolipase A2 (PLA2) remove o ácido graxo na posição sn-2 desta molécula. A ação de PLA1 (EC 3.1.1.32) e PLA2 (EC 3.1.1.4) resulta em a acumulação de ácidos graxos livres e de 2-acil lisofosfolípido ou 1-acil lisofosfolípido, respectivamente. O ácido graxo ainda ligado ao lisofosfolípido é, por sua vez, clivado por outras enzimas denominadas lisofosfolipases (liso-PL) (EC 3.1.1.5). A fosfolipase C (PLC) (EC 3.1.4.3) hidrolisa a ligação fosfodiéster no esqueleto fosfolípido para produzir 1,2-diacilglicerol e, dependendo do fosfolípido específico espécies envolvidas, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, etc. A segunda ligação fosfodiéster é clivada pela fosfolipase D (PLD) (EC 3.1.4.4), para originar o ácido fosfatídico e colina ou etanolamina, mais uma vez dependendo da classe de fosfolípido envolvida (GHANNOUM, 2000).

Barrett- Bee et al. (1985), foi o primeiro a avaliar o papel das fosfolipases extracelulares de *Candida* na virulência, por meio de um modelo murino da candidíase. Quando a atividade de fosfolipase foi medida em seis leveduras (quatro cepas de *C. albicans* e uma cepa única cada um *C. parapsilosis* e *S. cerevisiae*), uma correlação foi encontrada entre atividade fosfolipásica e dois parâmetros potenciais de patogenicidade. Os isolados de *C. albicans* que aderiram mais fortemente às células epiteliais bucais e eram mais patogênicos em camundongos apresentaram as maiores atividades fosfolipase. E os isolados menos patogênicos

de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. cerevisiae* foram menos aderente às células epiteliais e menos letal para ratos, e tiveram baixa atividade da fosfolipase.

Duas estratégias foram seguidas por Ibrahim et al. (1995) para determinar o papel da fosfolipase na virulência de *Candida*: (i) a capacidade de *C. albicans* isolados do sangue de pacientes e isolados da cavidade oral de voluntários saudáveis para produzir fosfolipase foram comparados, e (ii) a patogenicidade dos isolados clínicos com diferentes níveis de secreção de fosfolipase foi comparada em um modelo murino de candidíase disseminada. No primeiro estudo comparativo, 22 isolados de *C. albicans* foram testados (11 foram isolados de sangue obtidos de pacientes com candidíase disseminada, e 11 foram isolados comensais recuperados na boca de voluntários saudáveis). Diferenças marcantes entre as estirpes das duas fontes foi observado. Significativamente níveis mais elevados de produção de fosfolipase foram encontrados em isolados do sangue do que nos comensais. Além disso, os isolados de sangue tiveram taxas significativamente mais elevadas de germinação, e seus tubos germinativos foram maiores do que os tubos germinativos formados pelas estirpes comensais. Estes achados sugerem que as amostras isoladas de sangue, ao contrário de amostras comensais, podem ter um aumento na expressão de fatores de virulência, incluindo a germinação e a produção de fosfolipase, para poderem invadir os tecidos do hospedeiro.

3.4 Inibição de Fatores de Virulência

Recentemente, estudos têm sugerido um efeito de agentes antifúngicos na expressão de fatores de virulência de *Candida*. Willis et al. (2001) tratou pacientes diabéticos com nistatina ou fluconazol e verificaram que o tratamento com fluconazol reduziu a produção de fosfolipase por *C. albicans* que colonizava e infectava a cavidade oral. Anil e Samaranayake (2003) demonstraram em estudo *in vitro* que uma breve exposição (60 min) de *C. albicans* e *C. tropicalis* a concentrações subinibitória de nistatina e anfotericina B reduziu significativamente a atividade fosfolipásica de ambas as espécies. Wu et al. (2000), mostraram que a exposição de uma cepa de *C. albicans* suscetível ao fluconazol a este fármaco em concentrações subterapêuticas levaram a uma redução da atividade específica de proteinases (Saps), ao passo que o mesmo tratamento de um isolado resistente ao fluconazol levou a um aumento da atividade de proteinase extracelular específico. No estudo

de Kadir et al. (2007) investigou-se a atividade de fosfolipase de dez isolados de *C. albicans* (que produziam fosfolipase em níveis diferentes) expostos a duas concentrações subterapêuticas de clorexidina por um curto período de tempo (30 min), o que mostrou uma diminuição significativa do valor médio da produção fosfolipase.

3.5 Avaliação da Citotoxicidade

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos ou antiproliferativos da amostra-teste em culturas celulares. São de extrema importância durante o desenvolvimento de produtos (químicos, farmacêuticos, alimentícios, biológicos e físicos) destinados ao uso humano ou em animais (WEYERMANN et al., 2005).

Primeiramente, a avaliação da citotoxicidade de novos compostos químicos é realizada *in vitro*. Nesta etapa, as novas substâncias são submetidas ao contato direto com culturas celulares, com o objetivo de analisar o comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo. As vantagens dessa metodologia são, além do controle ambiental das células, a facilidade e a rapidez de sua execução e baixo custo. Após essa análise preliminar, devem-se realizar experimentos em animais para, em seguida, serem aplicados clinicamente em humanos (MARTINS et al., 2009).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material a ser testado direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células e, em tempo apropriado, observar as alterações celulares ocasionadas pelo produto. As alterações celulares podem ser observadas de diferentes modos, como por exemplo, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares provocadas pela ação de certas substâncias. O parâmetro mais utilizado para testar a toxicidade de um material é a avaliação da viabilidade celular que uma cultura de células apresenta após permanecer em contato com esse material (CIAPETTI et al., 1996).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para avaliação dos efeitos biológicos de um material, porém, apresentam limitações como a dificuldade de comparar os resultados encontrados nesses testes com a realidade das situações clínicas. Por outro lado, interpretações comparativas dos dados de toxicidade *in vitro*

forneem informações valiosas em relação ao potencial tóxico das substâncias (KOULAOUZIDOU et al., 1999).

De acordo com a ISO 10993 (*International Standard Organization*), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Posteriormente, comprovada a sua não toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do produto poderá ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO et al., 2003).

Os testes de citotoxicidade laboratoriais são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto causar alterações e morte celular, como consequências de dano das funções celulares básicas. Esses ensaios de citotoxicidade apresentam boa reprodutividade, fácil execução e baixo custo relativo, além de promover a redução do número de animais utilizados para avaliação de toxicidade (VALADARES, 2006).

Existem três possibilidades para o teste de citotoxicidade: o teste por eluição, o teste por contato direto e o teste por difusão em ágar. A técnica de método direto MTT [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazan, produto formado pela redução de tetrazólio MTT (MOSMANN, 1983). A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial. Esse método detecta o sinal gerado pela ativação de células vivas, cuja avaliação é realizada por um espectrofotômetro, que apresenta um alto grau de precisão na leitura de incrementos celulares para o estudo de citotoxicidade. As vantagens do método colorimétrico são a sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

3.5.1 Linhagem Celular

Uma vez que os fibroblastos são células muito importantes na regeneração dos tecidos, e como na cavidade bucal essas células estão presentes em todas as mucosas (jugal, gengival, ligamento periodontal e polpa dental), todas as substâncias utilizadas na Odontologia, como por exemplo, para o tratamento de

candidíase, devem ser biocompatíveis com essas células, não as lesionando e se possível, estimulando a sua proliferação (BERRIDGE et al., 1996).

3.6 Candidatos a Fármacos

Considerando que enormes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, a fim de atender a emergência de organismos que são resistentes a agentes quimioterapêuticos atuais e desenvolver novos compostos químicos que contornam os mecanismos de resistência a drogas existentes, este trabalho baseou-se em analisar como os ácidos graxos de cadeia média, ésteres derivados e alguns compostos da classe das oximas se comportam frente a fatores de virulência de fungos do gênero *Candida*.

Assim, buscou-se a seguinte revisão de literatura, para verificar as propriedades químicas e a atividade biológicas, até então conhecidas para cada classe. As metodologias usadas para os testes estão no ANEXO 1.

3.6.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos livres (FAAs) consistem de uma cadeia de átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio. O número de átomos de carbono varia, mas, geralmente os que estão envolvidos em sistemas biológicos têm um mesmo número compreendido entre 10 e 28 (Figura 2). Numa das extremidades da cadeia de carbono apresenta um grupo carboxila (-COOH) e, na outra extremidade, um grupo metila (-CH₃). O grupo carboxila é hidrofílico e ionizado quando dissolvido em água, enquanto que a cadeia carbônica é hidrofóbica, tornando a molécula inteira anfipática.

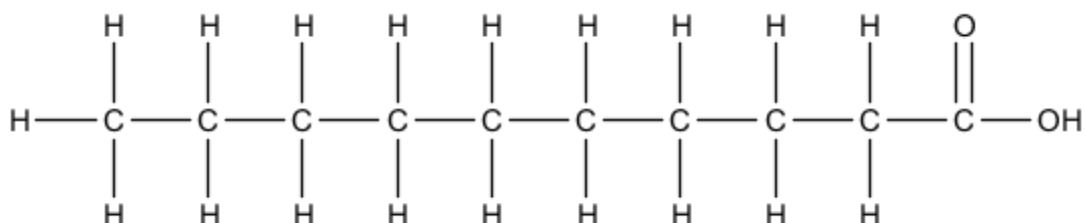


Figura 2. Estrutura química geral de um ácido graxo.

Os ácidos graxos que ocorrem com mais frequência na natureza são conhecidos pelos seus nomes comuns, como por exemplo, os ácidos butírico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico. Na Tabela 1 estão alguns dos principais ácidos graxos e seus respectivos nomes oficiais, segundo a IUPAC.

FFAs com menos que 8 átomos de carbono são considerados de cadeia curta, enquanto aqueles com mais que 16 átomos de carbono são considerados de cadeia longa. FAs insaturados têm uma ou mais dupla (C=C) ligações na cadeia de carbono, enquanto que os átomos de carbono nas FFAs saturada estão todos ligados por (C-C) ligações simples (DESBOIS & SMITH, 2010).

As propriedades antimicrobianas de alguns ácidos graxos livres são bem conhecidas, como atuam através de diferentes mecanismos que a maioria dos antibióticos convencionais, eles oferecem um potencial para a exploração comercial (DESBOIS & SMITH, 2010). No entanto, há poucos relatos sobre o modo pelo qual eles atuam nos fatores de virulência de *Candida* (BERGSSON et al., 2001; HUANG et al., 2011).

Tabela 1. Nomenclatura de ácidos graxos saturados que ocorrem em óleos e gorduras.

Nomenclatura usual	Nomenclatura oficial	Nº de Carbonos	PF	FM
Ácido Butírico	Ácido Butanóico	4:0	-4,2	C ₄ H ₈ O ₂
Ácido Capróico	Ácido Hexanóico	6:0	-3,4	C ₆ H ₁₂ O ₂
Ácido Caprílico	Ácido Octanóico	8:0	16,7	C ₈ H ₁₆ O ₂
Ácido Cáprico	Ácido Decanóico	10:0	31,6	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
Ácido Láurico	Ácido Dodecanóico	12:0	44,2	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	54,4	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido Palmítico	Ácido Hexadecanóico	16:0	62,9	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	69,6	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido Araquídico	Ácido Eicosanóico	20:0	75,4	C ₂₀ H ₄₀ O ₂

Os ácidos graxos livres têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. As propriedades antimicrobianas de ácidos graxos são utilizadas por vários organismos como defesa contra microrganismos parasitas ou patogênicos. Há vários estudos sobre a atividade biológica destes ácidos graxos de cadeia média contra: algas, bactérias (Gram positivas e Gram negativas), fungos, protozoários, vírus, larvas de camarão de água salgada, além da redução da expressão de fatores de virulência de bactérias como as β -lactamases e hemolisinas (DESBOIS & SMITH, 2010). Além disso, outras investigações têm reportado a ação desses compostos contra o vírus do herpes *simplex*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *estreptococos* do grupo A, *estreptococos* do grupo B e *Staphylococcus aureus*. O mecanismo pelo qual estes ácidos matam as bactérias não é conhecido, porém alguns estudos indicam que eles rompem as membranas celulares dos microorganismos (BERGSSON et al., 2001).

Bergsson et al. (2001) em seu estudo da susceptibilidade de *Candida albicans* a vários ácidos graxos e os seus 1-monoglicerídeos, demonstrou que apenas o ácido cáprico e o láurico apresentaram a capacidade de matar *Candida albicans* na concentração de 5mM, o ácido cáprico, promoveu a morte mais rápida e mais eficaz de todas as três estirpes de *C. albicans* testadas, deixando o citoplasma desorganizado e encolhido, devido a uma ruptura ou desintegração da membrana plasmática. Já o ácido láurico, foi o mais ativo em concentrações mais baixas e após um tempo de incubação mais longo.

3.7.2 Ésteres

Ésteres de ácidos graxos e derivados são usados em uma vasta gama de produtos como, por exemplo, em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica, devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (HOBUSS et al., 2012).

A reação de formação de ésteres através de ácidos graxos é denominada esterificação, que consiste na obtenção de ésteres a partir da reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), com formação de água como subproduto (Figura 3). A reação de esterificação pode ser catalisada por catalisadores ácidos de Brønsted ou de Lewis, por catalisadores básicos de Lewis, além de enzimas (CARDOSO, 2008).

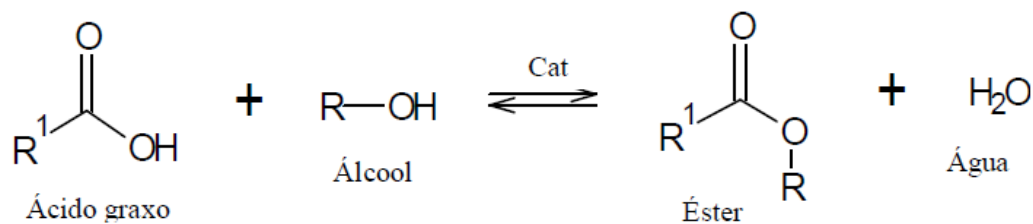


Figura 3. Esquema demonstrando a reação de esterificação do ácido carboxílico.

A reação de esterificação é um processo reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (esterificação) como a reação inversa (hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool (CARDOSO, 2008).

Nesta reação, no procedimento mais comum, o ácido carboxílico é protonado por um ácido de Bronsted, facilitando o ataque nucleofílico do álcool na carbonila, formando um intermediário tetraédrico que posteriormente sofre um rearranjo, seguido da perda de uma molécula de água e formando uma molécula de éster, como demonstrado na Figura 4.

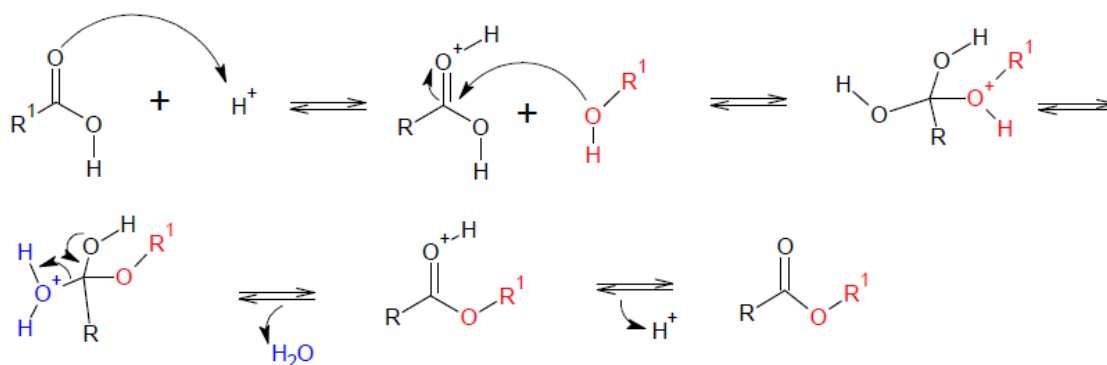


Figura 4. Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Bronsted.

3.7.3. Oximas

Oximas são derivados da reação aldeídos e cetonas com cloridrato de hidroxilamina e tem grande aplicação na química orgânica, como por exemplo, a proteção do grupo carbonila em moléculas orgânicas, o que a torna um importante intermediário em rotas sintéticas devido à possibilidade de regeneração de seu substrato (ALI et al., 2006; KIASAT et al., 2004).

O termo oxima foi primeiramente definido no século XIX e deriva das palavras oxigênio e imina (oxigênio + imina) = oxima. As oximas são compostos orgânicos cuja fórmula geral é $RR'C=NOH$, onde o R é um substituinte orgânico e R' pode ser hidrogênio ou um grupo orgânico qualquer. Podem ser classificados como bases fracas de Lewis quando formarem sais com ácidos minerais concentrados e ácidos fracos de Lewis quando dissolvidos em bases diluídas.

A técnica utilizada na preparação destas oximas utiliza como solvente a água, o que torna a reação menos agressiva ao meio ambiente, além de proporcionar bons rendimentos em 4 horas de reação (ALI et al., 2006; KIASAT et al., 2004).

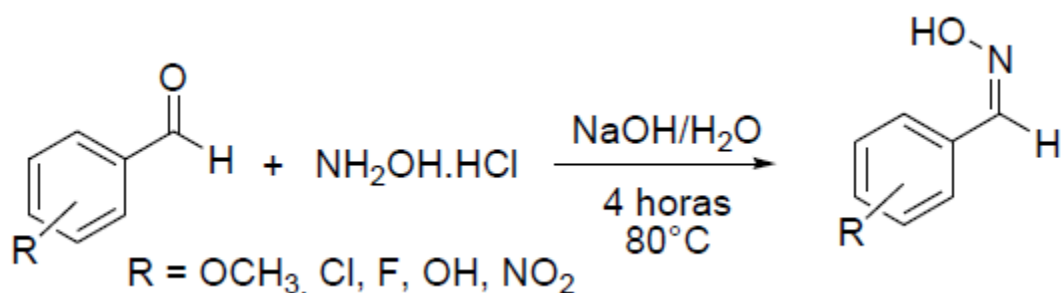


Figura 5. Síntese de oximas a partir de diferentes benzaldeídos substituídos.

As oximas são compostos sólidos, que apresentam pouca solubilidade em água e podem ser classificadas como aldoximas ou cetoximas. As aldoximas são formadas a partir da reação de hidroxilamina (NH_2OH) com um aldeído, e as cetoximas são formadas a partir da reação da hidroxilamima com uma cetona (PERES, 2009).

Recentemente, tem-se relatado a síntese e estudos biológicos de muitas substâncias, as oximas e os derivados são compostos muito importantes na indústria química e na química medicinal (PRUSHAN et al., 2000). Algumas oximas

e os seus derivados alquila, oxialquila e amino possuem atividade fisiológica e biológica (KARATAS & UÇAN, 1998; CANPOLAT, 2005). Além disso, derivados éter de oxima também são um grupo farmacofóro altamente eficiente, que atua como encaixe estrutural chave em um grande número de suportes de drogas e compostos bioativos. Por exemplo, anti-inflamatórios (cloximate), antibióticos macrólidos (roxitromicina), reguladores de crescimento de insetos (flucicloxuron) e agentes antifúngicos (econazole) (KARATAS, 1998; CANPOLAT, 2005).

Oximas esteroides e seus derivados são conhecidos por apresentar características anti-inflamatórias, anticancerígeno, e atividade fisiológica. Segundo Sikharulidze et al. (2010), em um teste *in vitro* da ação biológica de um esteroide oxima, essa classe mostrou-se ativa contra as estirpes de vários fungos (*Sporobolom salmonicolor*, *C. glabrata*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus terreus*, *A. niger*, *A. fumigatus*), e sua atividade pode ser comparável com a da anfotericina B e da nistatina.

Algumas oximas são inibidores da tirosinase altamente ativos para o clareamento da pele ou antiescurecimento, porque eles podem ser capazes de complexar os dois átomos de cobre no sítio ativo da tirosinase. Algumas oximas de aldeídos aromáticos (por exemplo, 4-benzaldoxima e fluorobenzaldoxime) provaram serem eficazes inibidores de aldose-redutase que competem com agentes farmacológicos utilizados para inibir esta enzima *in vivo* (LI et al., 2006).

O surgimento de novas oximas e as descobertas a cerca da ação biológica de alguns compostos dessa classe, são fatores importantes que devem ser considerados para a realização de estudos em busca de novos fármacos com ação antifúngica.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Artigo 1

Ácidos graxos alifáticos e ésteres derivados: Inibição do crescimento e produção de exoenzimas de *Candida*, e sua citotoxicidade *in vitro*.

Juliana L. S. Souza · Adriana F. da Silva · Pedro H. A. Carvalho · Bruna S. Pacheco ·
Cláudio M. P. Pereira · Rafael G. Lund

Artigo formatado conforme as normas do periódico ***International Journal of Antimicrobial Agents***

Status: submetido (conforme ANEXO 4)

Aliphatic Fatty Acids and Esters: Inhibition of growth and exoenzyme production of *Candida*, and their cytotoxicity *in vitro*

Anti-Candida effect and cytotoxicity of fatty acids and esters

Juliana L. S. Souza^a · Adriana F. da Silva^b · Pedro H. A. Carvalho^a · Bruna S. Pacheco^c · Cláudio M. P. Pereira^c · Rafael G. Lund^{*a}

^a *Laboratory of Microbiology, Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas (UFPel) – Gonçalves Chaves, 457 / 702, Zip code: 96015-560, Pelotas/RS, Brazil.*

^b *School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel) – Gonçalves Chaves, 457 / 503, Zip code: 96015-560, Pelotas/RS, Brazil.*

^c *Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.*

Address correspondence to Rafael Lund, Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas (UFPel) – Rua Gonçalves Chaves, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas RS Brazil, Tel/Fax: + 00 55 53 3222-6690; E-mail: rafael.lund@gmail.com

Abstract

The secretion of extracellular phospholipases and proteinases of *Candida* has been described as a relevant virulence factor in human infections. Aliphatic fatty acids have antimicrobial properties, but the mode by which they act in the virulence factors of microorganisms, such as *Candida*, is still unclear. Moreover, there are few reports about their toxicity. Current study investigated the *in vitro* antifungal activity, exoenzyme production and cytotoxicity of some aliphatic fatty acids and their esters derivatives against the *Candida* species. The minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentrations of aliphatic medium-chain fatty acids, methyl and ethyl esters were performed by the CLSI M27-A3 method. The influence of these compounds in the inhibition of the production of hydrolytic enzymes, phospholipase and proteinase by *Candida* was also investigated. Lauric acid was the fatty acid with the best result on MIC against *Candida* species although its esters derivatives showed no activity. The inhibition of phospholipase was more significant than proteinase production by *Candida*. Tested fatty acids revealed more than 80% cell viability in their MIC concentrations and cell viability at 100% was reported in concentrations with anti-enzymatic effect. Therefore, the potential use of these fatty acids could be the base for more antimicrobial tests.

Keywords: fatty acids, antifungal agents, *Candida*, exoenzyme production, cytotoxicity, *in vitro* assays.

1. Introduction

Great efforts have been made to develop new antimicrobial drugs in order to keep pace with the emergence of organisms that are resistant to current chemotherapeutics and to develop new chemical compounds that circumvent existing drug resistance mechanisms. The screening of natural product libraries may provide useful chemical entities for the development of new antimicrobial agents with low toxicity.¹

The antimicrobial properties of some free fatty acids are well-recognized. Since they act through different mechanisms to most conventional antibiotics, they have a potential factor for commercial exploitation.² However, there are few reports about the mode by which they act in the virulence factors of *Candida* and their cytotoxicity.³⁻⁵

Candida species develop specific virulence mechanisms that confer the ability to colonize host epithelial cells, to invade deeper cells or to influence host defenses.⁶ The ability of *Candida albicans* to persist within the host and cause infection has been attributed to many virulence properties, which include: adhesion, dimorphism, the ability to switch between different morphological types, interference with the immune system, synergism and the production of extracellular enzymes, such as proteinase and phospholipase.^{7,8}

One of the most important virulence factors of *Candida* is extracellular proteinases and phospholipases.⁹ The secreted aspartic proteinases are responsible for adhesion, tissue damage and invasion of host immune responses. Their proteolytic activity has been associated with tissue invasion.¹⁰ The secretion of extra cellular phospholipases is considered a key attribute that aids invasion of the host mucosal epithelia. Phospholipases, in general, catalyze the hydrolysis of phospholipids which are the major components of all cell membranes.¹¹

Current study investigates *in vitro* antifungal activity, exoenzyme production and cytotoxicity of some aliphatic fatty acids and their ester derivatives against *Candida* species.

2. Materials and Methods

2.1. Antifungal agents

The antifungal assay was carried with medium-chain fatty acids (octanoic acid, capric acid, lauric acid), and a long-chain fatty acid (myristic acid) obtained from Aldrich (Steinheim, Germany) and their methyl and ethyl ester derivatives synthesized by Hobbus et al.¹² Ten dilutions of the compounds were prepared with concentrations that ranged from 0.005 to 2.5 mg/mL in ethanol, with a fold dilution of 0.5. The general structure of each compound is shown in Table 1. Fluconazole was used as reference compound.¹³

2.2. Isolates and culture conditions

Eight strains of *C. albicans* and six non-*albicans Candida* strains were used for determining the *in vitro* anti-fungal activity of fatty acids and their derivatives of six species of oral yeasts: *C. albicans* (8), *C. parapsolisis* (1), *C. lipolytica* (2), *C. tropicalis* (1), *C. famata* (1), *C. glabrata* (1). The strains were obtained from the Laboratory of Oral Microbiology, Pelotas Dental School of the Federal University of Pelotas RS Brazil. Samples were cultivated aerobically on SDA (Sabouraud dextrose agar) with chloramphenicol at $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 24 h.

2.3. Antifungal activity

The antifungal assay was carried out following CLSI M27-A3 method.¹⁴ After a 24-h incubation period of *Candida* strains on fresh SDA, yeasts were harvested and suspended in sterile RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) culture medium at turbidity equal to optical density of 0.5 McFarland. The final suspension was adjusted to 1.5×10^8 yeast /mL. The solution containing each fungal inoculum was transferred in aliquots of 100 μL into each well of the sterile 96-well plate that already had 100 μL of the solution containing the dilution

of the compound tested. The plates were incubated at 37 °C for 48 hours. The readings were made visually. So that the minimum fungicidal concentrations (MFC) could be evaluated, 20 µL of each solution, considered a minimum inhibitory concentration (MIC), were placed into a plate containing SDA. The MFCs were defined as the lowest drug dilutions that did not yield growth of yeast colonies (100% killing activity) after 24 h of aerobic incubation at 37 °C.¹⁴

2.4. Enzymatic activity determination by the agar plate method.

All *C. albicans* isolates were tested, in duplicate, to verify the enzymatic activity of proteinases and phospholipases. The test medium for proteinases was BSA (bovine serum albumin) agar medium containing 2 g of BSA, 1.45 g of YNB (yeast nitrogen base—Difco Laboratories, Detroit), 20 g of glucose and 20 g of agar per litre of distilled water. The test medium for phospholipases consisted of SDA containing 57.3 g of sodium chloride, 0.55 g of calcium chloride, and 100 mL of 50% sterile egg yolk (egg yolk enrichment) per litre of distilled water. Test isolates were grown on SDA for 24 h, and were suspended in 1% sterile PBS (phosphate buffered saline), with refraction and visual turbidity equal to 0.5 McFarland unit (1.5×10^8 yeast/mL). For each fatty acid used, they were first diluted in ethanol at a concentration, the MIC and three following smaller concentrations. For each concentration, starting from the highest, 20 µL were emulsified in 1980 µL of sterile PBS.

Eight strains of *C. albicans* were prepared in a cell suspension (10^8 yeast/mL) of each strain to determine the effect of fatty acids on phospholipase and proteinase activity. From this cell suspension, 0.5 mL were added to tubes containing 2 mL of PBS (control) and 2 mL of PBS/fatty acid. The above diluted the cell suspension and provided between 10^6 and 10^7 cells/mL in each assay tube. The tubes were then incubated for 30 min at 37 °C. The agent

was then removed by two cycles of dilution with sterile PBS and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The supernatant was completely decanted and the yeast pellets were re-suspended in 2.5 mL of sterile PBS. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and 72 h for proteinases and phospholipases, respectively, following Samaranayake et al.¹⁵ The enzymatic activity was determined by the formation of a halo around the yeast colony, and measured in terms of the ratio of the diameter of the colony to the total diameter of colony plus zone of precipitation (Pz), according to the method described by Price et al.¹⁶ According to this system, Pz = 1.00 means that the test strain is negative for phospholipase, while a value of Pz - 0.63 signifies that the test strain is releasing large amounts of phospholipase. Values of Pz of between 0.64 and 0.99 signify that the test strain is releasing small amounts of phospholipase. The proteinase activity was measured in the same manner as described for phospholipase.

2.5. Cytotoxicity

2.5.1. Cell culture

Cell culture medium was DMEM (Dulbeccos' s Modified Eagle Medium), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/mL). Mouse fibroblasts of the L-929 immortalized cell line were maintained as a stock culture in DMEM medium and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air until achieving sub confluence.

2.5.2. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay was performed according to ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity (MTT Assay): The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma Chemical Company, St. Louis MO USA) assessed cell metabolic function by mitochondrial

dehydrogenase activity. Mouse fibroblasts L-929 (1×10^4 /well) were maintained in DMEM medium in 96-well plates for 24h. After incubation, medium was removed and different tests were performed according to the fatty acids experimental groups at different concentrations (10x, 1x, 0.1x, 0.01x and 0.001x; MIC obtained in the antifungal assay) for each compound respectively. During the cytotoxicity assays the negative control consisted of fibroblast cells in DMEM with no fatty acids added.¹⁷

The cytotoxicity produced for each different group was assessed with a 24-h cell exposure. After removing the fatty acids, 200 μ L of medium was added to 20 μ L of MTT solution (5 mg of MTT/mL PBS) and placed in each well. After 4h incubation at 37°C in darkness, the blue formazan precipitate was extracted from the mitochondria using 200 μ L/well dimethyl sulfoxide (DMSO) on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption was determined by spectrophotometer at 540 nm wavelength. Four samples were prepared for each group in both tests and the toxicity assay was repeated at least twice.

2.6. Statistical analyses

Data of anti-enzimatic activity and cytotoxicity of treatment groups and controls were compared by One Way Analysis of Variance on Ranks and Kruskal-Wallis. Differences among groups were considered to be significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with SigmaPlot 12.0.

3. Results

Table 2 shows the results of antifungal activity obtained experimentally. Results showed that only the medium-chain fatty acids have antifungal activity at the concentrations tested. In fact, methyl and ethyl esters showed no activity at the concentrations tested and were not taken into account for the following tests.

Anti-enzyme tests were conducted only for compounds with anti-*Candida* activity. As the non-*albicans Candida* did not express hydrolytic enzymes, tests were done only for *C. albicans*, based on the concentration of the fatty acid MIC, and three smaller following.

The best results obtained in inhibiting exoenzyme production were for Caprilic acid with 42% of phospholipase inhibition and 8% of proteinase inhibition. Capric acid presented 23% and 7%; lauric acid inhibited 12% and 6% for phospholipase and proteinase respectively at concentrations shown in Table 3.

Although all compound showed some statistical difference between the concentrations, it were not considered, because inhibition tests of hydrolytic enzymes, protease and phospholipase were carried out for eight strains of *C. albicans* in triplicate. Since the results are expressed as mean of these data, a high value for the standard deviation is justified since *Candida* strains are clinical isolates, some with more susceptibility than others.

Caprilic acid had no cytotoxic effect on the dilutions tested, whereas capric acid showed antiproliferative effect on MIC. Lauric acid was the most cytotoxic at higher concentrations since miristic acid was not cytotoxic at any concentration tested.

Comparing the different tested concentrations of the all fatty acids, lauric acid was toxic at the highest concentration tested and the concentration of caprilic acid MIC was the least cytotoxic. Table 4 shows results of cell viability. Tested fatty acids revealed more than 80% cell viability in their MIC concentrations. Cell viability at 100% was reported in concentrations with anti-enzymatic effect. According to the new edition of ISO 10993 - 5:2009, samples with 30% decrease in cell viability are cytotoxic. Consequently, all samples in current study are not cytotoxic.

4. Discussion

Results in Table 2 demonstrated that antifungal activity of each fatty acid is influenced by its structure. The increase of carbon chain reduced anti-*Candida* activity of fatty acids. Furthermore, the –OH group is essential for activity. Both methyl and ethyl esters showed no capacity to inhibit *Candida* growth in any of the tested concentrations. The literature contains contrasting reports concerning the relationship between fatty acids structure and its antimicrobial activity. The –OH group of the carboxyl group seems to be important for the antimicrobial activity of fatty acids since methylated fatty acid often has shown reduced or no activity.¹⁸ The fatty acid with the best anti-*Candida* result was lauric acid; esters failed to show any activity.

These results corroborate the previous findings of Bergsson et al.⁵ with respect to the susceptibility of *C. albicans* to several fatty acids and their 1-monoglycerides. Their study also showed that capric acid, causes the fastest and most effective killing of all three strains of *C. albicans* tested, leaving the cytoplasm disorganized and shrunken because of a disrupted or disintegrated plasma membrane.

Table 3 reveals that even at exposures to concentrations of fatty acids smaller than the minimum inhibitory, *Candida* presents a reduction of its capacity to express hydrolytic enzymes, with better activity in inhibiting phospholipase production. Table 3 shows that inhibition of phospholipase was more significant than proteinase production. These results are important because one of the most important virulence factors of *C. albicans* is extracellular phospholipases which degrade phospholipids constituents of host cell membrane and leads to a disruption of host cells or alteration of surface characteristics that facilitate adherence and subsequent infection.⁶

It may be observed that there is no meaningful difference for each fatty acid in their inhibition between the concentrations tested. However, in all concentrations some reduction in

the expression of these enzymes was detected. Above results suggest that fatty acids continue to inhibit virulence factors that are important in the pathogenesis of *C. albicans*, even at concentrations three times lower than the MIC. This fact shows that enzymatic activity may play an essential role in the capacity that this fungus has to establish itself as a colonizing and/or infectious microorganism. Therefore, the potential use of these fatty acids could be the basis for more tests.

The published data have already showed the potential of fatty acids as natural antimicrobial agents, however the previous literature focused on microbial killing properties of fatty acids and this effect should be carefully analyzed when related with the recent concerning about antimicrobials resistance.^{19,20} Drugs which objectify the inhibition of virulence factor arises as a potential way to avoid the development of resistance, and drugs concentrations that promotes virulence factor inhibition should also be considered as antimicrobial concentrations.²¹

The differences between phospholipase and proteinase inhibitions are probably related with the releasing mechanisms of each hydrolytic enzyme studied. In fact, the phospholipases seems to be associated to a cytoplasm membrane releasing mechanism due to the way proteinases are related with a Golgi complex and to lissome way of excretion.^{4,8,9} With regard to these excretions, particularities could be suggested that fatty acids tested present some site of affinity on yeasts cellular membrane with a higher effect on phospholipase inhibition.

The choice of concentration in Table 4 for the cytotoxicity test was based on the results obtained in MIC. These concentrations had a 10 fold dilution and were tested by cytotoxicity assay (Table 4). Although concentrations of fatty acids may be high, they have low toxicity in concentrations that demonstrated activity and in higher concentrations.

5. Conclusions

It may be concluded that fatty acids present potential enzymatic inhibition effect on *C. albicans* and low cytotoxicity at sub-antifungal concentrations. Therefore, the potential use of these fatty acids could be the base for more antimicrobial tests.

Acknowledgments

Current research was funded by CNPq, CAPES and UFPEL.

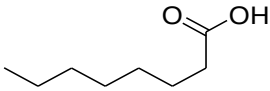
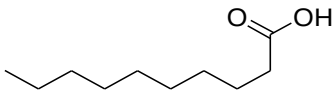
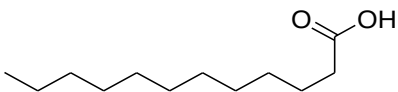
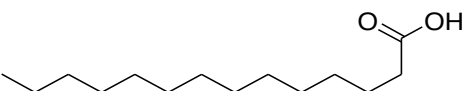
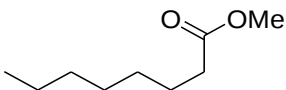
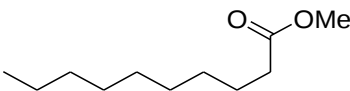
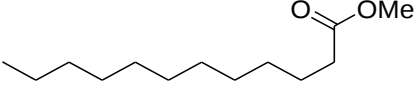
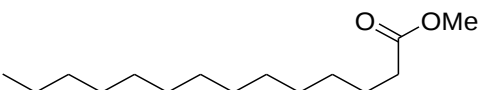
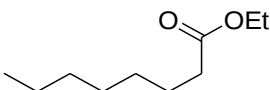
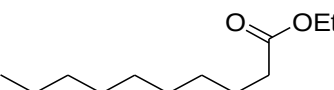
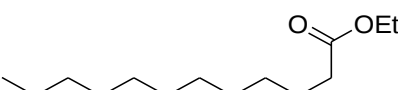
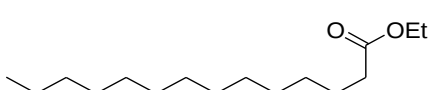
References

1. Lu H and Tongue PJ. Inhibitor of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. *Acc. Chem. Res* 2008;41:11–20.
2. Desbois AP & Smith VJ. Mini-Review Antibacterial free fatty acids activities mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85:1629–40.
3. Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 2011;56:650–4.
4. Huang CB, George B, Ebersole JL. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 2010;55:555–560.
5. Bergsson G, Arnfinnsson JH, Steingrímsson OL, Halldor Thormar H. *In Vitro* Killing Of *Candida Albicans* By Fatty Acids And Monoglycerides. *Antimicrob Agents Ch* 2001;45:3209–12.
6. Kadir T, Gümrü B, Uygün-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol* 2007;52:691– 6.
7. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ, et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with

- diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(3):327–31.
8. Fonzi WA. The protein secretory pathway of *Candida albicans*. *Mycoses* 2009;52:291–303.
 9. Barros LM, Boriollo KF, Alves AC, Klein MI, Gonçalves RB and Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol* 2008; 53:1172–1178.
 10. Hube B, Naglik. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 2001;147:199 –205.
 11. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Yet al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995;63:1993–1998.
 12. Hobuss CB, Venzke D, Pacheco BS, Souza A, Santos MAZ, Moura S et al. Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. *Ultrason Sonochem* 2012;19:387–89.
 13. Duval AR, Carvalho PH, Soares MC, Gouvêa DP, Siqueira GM, Lund RG et al. 7-Chloroquinolin-4-yl arylhydrazones derivatives: synthesis and antifungal activity. *Sci World J* 2011;11:1489–95.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute Document M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard - Third Edition. 2008.
 15. Anil S and Samaranayake LP. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Chemotherapy* 2003;49:243–47.

16. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982;20(1):7–14.
17. International Organization for Standardization. ISO 10993-5; Biological testing of medical and dental materials devices – part 5 Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. Switzerland. 2009.
18. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, and Walsh T J. Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *J. Clin. Microbiol* 2008;40:3204–08.
19. Ramage GS, Milligan DF, Lappin L Sherry P, Sweeney C, Williams J et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol* 2012;3:220–8.
20. Kanafani ZA and Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Infect Dis* 2008;46:120–8.
21. Falsetta ML, Kleim IM, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, Scott-Anne KK et al. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expressions *in vivo*. *Antimicrob Agents Ch* 2012;56(12):1381–12.

Table 1. The general structure of each compound tested against *Candida* species.

Structure	MF ^a MW ^b (g/mol)	
	C ₈ H ₁₆ O ₂ 144.21	Fatty acids
	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ 172.26	
	C ₁₂ H ₂₄ O ₂ 200.32	
	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ 228.37	
	C ₉ H ₁₈ O ₂ 158.24	Methyl esters
	C ₁₁ H ₂₂ O ₂ 186.29	
	C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 214.34	
	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ 242.40	
	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ 172.26	Ethyl esters
	C ₁₂ H ₂₄ O ₂ 200.32	
	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ 228.37	
	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ 256.42	

^a molecular formula; ^b molecular weight

Table 2. Screening of fatty acids and esters against strains of *Candida* spp.

Compound	MFC/MIC (mg/mL)					
	<i>C. albicans</i> (n=8)	<i>C. parapsilosis</i> (n=2)	<i>C. famata</i> (n=1)	<i>C. glabrata</i> (n=1)	<i>C. lipolytica</i> (n=1)	<i>C. tropicalis</i> (n=1)
Caprilic acid	1.2/0.6	1.2/1.2	1.2/0.6	1.2/1.2	2.5/2.5	2.5/2.5
Capric acid	0.3/0.3	0.6/0.6	0.3/0.3	0.6/0.6	1.2/0.6	0.6/0.6
Lauric acid	0.6/0.3	0.6/0.6	0.6/0.3	0.6/0.3	0.6/0.3	1.2/0.6
Miristic acid	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	2.5/2.5	2.5/2.5	2.5/2.5	>2.5/>2.5
Methyl esters	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5
Ethyl esters	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5	>2.5/>2.5
Fluconazole	0.016/0.016	0.002/0.002	0.004/0.004	0.002/0.002	0.008/0.008	0.002/0.002

Rates are the mean of at least three determinations.

Table 3. Comparison between Pz results of tests, control and inhibition ratio results in percentage for Phospholipase and Proteinase production.

Concentration (mg/mL)	Phospholipase			Proteinase		
	Control Pz (mean±SD)	Pz (mean±SD)	Inhibition Ratio (%)	Control Pz (mean±SD)	Pz (mean±SD)	Inhibition Ratio (%)
Caprilic acid						
0.3	0.54 ± 0.09	0.73 ± 0.08	42.9 ± 12.1	0.14 ± 0.02	0.21 ± 0.05	8.5 ± 4.8
0.15	0.52 ± 0.06	0.67 ± 0.04	30.7 ± 11.8	0.14 ± 0.02	0.21 ± 0.07	8.1 ± 7.0
0.08	0.58 ± 0.05	0.69 ± 0.04	24.9 ± 16.7	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.05	5.0 ± 4.7
0.04	0.59 ± 0.05	0.70 ± 0.03	25.7 ± 11.5	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.03	4.6 ± 2.1
Capric acid						
0.6	0.52 ± 0.05	0.64 ± 0.04	24.0 ± 15.3	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.01	4.7 ± 0.5
0.3	0.50 ± 0.04	0.59 ± 0.05	18.0 ± 11.9	0.11 ± 0.01	0.17 ± 0.01	7.6 ± 0.5
0.15	0.47 ± 0.05	0.54 ± 0.04	13.0 ± 7.0	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.03	5.5 ± 2.8
0.08	0.46 ± 0.05	0.59 ± 0.10	23.5 ± 12.6	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.03	5.0 ± 3.4
Lauric acid						
0.6	0.50 ± 0.05	0.54 ± 0.05	8.2 ± 1.9	0.14 ± 0.04	0.18 ± 0.05	4.9 ± 2.9
0.3	0.50 ± 0.05	0.55 ± 0.05	11.2 ± 7.2	0.14 ± 0.04	0.19 ± 0.05	5.8 ± 3.7
0.15	0.46 ± 0.04	0.53 ± 0.05	12.4 ± 3.9	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.04	6.8 ± 3.8
0.08	0.46 ± 0.04	0.52 ± 0.05	11.2 ± 6.8	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.03	3.9 ± 3.5

Table 4. Cell survival percentage for L-929 mouse fibroblasts exposed to tested agents.

Compound	Tested concentrations groups*				
	10 x	1 x	0.1 x	0,01x	0,001x
Caprilic acid	^A 56.3 ^b	^A 109.7 ^a	^A 107.3 ^a	^A 109 ^a	^A 107.7 ^a
Capric acid	^C 36.8 ^b	^B 81.5 ^b	^A 109.4 ^a	^A 115 ^a	^A 116.3 ^a
Lauric acid	^C 7. 2 ^c	^B 81.1 ^b	^A 101.9 ^b	^A 101.6 ^b	^A 101.8 ^b
Miristic acid	^A 85.7 ^a	^A 99.1 ^b	^A 98.5 ^b	^A 102.4 ^b	^A 102.4 ^b

* Concentrations are indicated by multiples of minimum inhibitory concentration for antifungal tests.

** Different lower case letters indicate statistic difference between rows and upper case letters indicate difference between columns.

4.2 Artigo 2

Susceptibilidade antifúngica, produção de exoenzimas e citotoxicidade de oximas contra *Candida*

Souza, J. L. S.; Nedel, F.; Ritter, M.; Carvalho P. H. A.; Pereira C. M. P.; Lund, R. G.

Artigo formatado conforme as normas do periódico **Mycopathlogia**.

Status: submetido (conforme ANEXO 5)

Antifungal susceptibility, exoenzyme production and cytotoxicity of novel oximes against *Candida*

Souza, J. L. S.¹; Nedel, F.²; Ritter, M.³; Carvalho P. H. A.¹; Pereira C. M. P.²; Lund, R. G^{1*}.

¹ *Laboratory of Oral Microbiology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel) – Rua Gonçalves Chaves, 457 / 503, Zip code: 96015-560, Pelotas RS Brazil.*

² *Laboratory of Cell and Tissue Biology (NCTBio), Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas RS Brazil.*

³ *Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas RS Brazil.*

* Address correspondence to Rafael Lund, Postgraduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel)– Rua Gonçalves Chaves, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas RS Brazil, Tel/Fax: + 00 55 53 3222-6690; E-mail: rafael.lund@gmail.com

Abstract

A novel oximes were synthesized and evaluated *in vitro* antifungal activity against *Candida* and determined their cytotoxicity. The procedure used for the synthesis of oximes agrees with the current trend in the field of chemistry characterized by the principles of green chemistry. Water is employed as solvent in this reaction. The minimum inhibitory and minimum fungicidal concentrations of oximes were performed by the CLSI M27-A3 method. The influence of these compounds in the inhibition of the production of hydrolytic enzymes, phospholipase and proteinase by *Candida* was also investigated. Compounds showed a great ability to inhibit phospholipase with 50% reduction in most cases. However, tested compounds for proteinase did not affect the enzyme. Current results showed a great reduction in phospholipase production which suggests that compounds of this class may interfere with the invasion of the host and disease growth. The oximes examined showed less fungicidal activity than fluconazole, but interfered significantly in expression of phospholipase. Some oximes included in this study can be a good matrix for the development of novel antifungal compounds.

Keywords: *Oximes, antifungal agents, proteinase, phospholipase, cytotoxicity.*

Introduction

Since over a certain period of time some species of *Candida* have shown resistance to specific treatments, the development of other methods has become mandatory to overcome infection [1-3]. The search for new drugs that interact differently with the pathogen is highly relevant.

The synthesis and biological studies of many substances such as dihydropyrimidinones [4], pyrroles [5], pyrazoles [6], thiazoles [7] and chalcones have been recently reported [8]. Within the context of current program research in bioactive molecules, the easy synthesis of oximes and their antimicrobial study have been demonstrated. Oximes and their derivatives are specifically very important compounds within the chemical industry and in medicinal chemistry [9]. For example, oxime compounds are used as antidotes for nerve agents. A nerve agent inactivates acetylcholinesterase molecules by the molecule's phosphorylation. Some oximes and their alkyl, oxyalkyl and amino derivatives have physiological and biological activities [10,11]. Moreover, the oxime ether group is also a highly efficient pharmacophore which acts as the key structural motif in numberless drug scaffolds and bioactive compounds. For example, anti-inflammatory (cloximate), macrolide antibiotics (roxithromycin), insect growth regulators (flucycloxuron) and antifungal agents (econazole) contain oxime ether [10,11]. Steroidal oximes and their derivatives are known to exhibit anti-inflammatory, anticancer and other types of physiological, antimicrobial and anti-inflammatory activities [12]. Some oximes are highly active tyrosinase inhibitors for skin lightening or anti-browning since they are able to complex the two copper atoms in the tyrosinase's active site. Some anti-oximes of aromatic aldehydes (e.g., benzaldoxime and 4-fluorobenzaldoxime) have proved to be effective inhibitors of aldose reductase, rivaling pharmacological agents currently used to inhibit this enzyme *in vivo* [13].

The species *Candida* develops specific virulence mechanisms that make it capable of colonizing host epithelial cells, invade deeper cells or influence host defenses [14]. Many factors have been suggested as attributes of virulence in *C. albicans*. These include hyphal formation, surface recognition molecules, phenotypic switching and extracellular hydrolytic enzyme production. In fact, they have been the most widely studied in recent years [14-17].

The most important factor that contributes to the process of virulence is hydrolytic enzyme production with a central role in the pathogenicity of bacteria, protozoa and pathogenic yeasts [15]. Although many microorganisms possess a variety of hydrolytic enzymes, proteinases and phospholipase are by far the most commonly associated with virulence [17]. Secreted aspartyl proteinases are capable of degrading epithelial and mucosal barrier proteins and consequently invade oral surfaces more easily. Phospholipase enzymes degrade phospholipids on the cell membrane. The activation of this enzyme causes the derivation of lysophospholipids from phospholipids and leads towards the deterioration of the biological membrane [18]. The exoenzymes, secreted aspartyl proteinases and phospholipases, degrade immunoglobulins and proteins from the extracellular matrix, inhibit the phagocytosis of polymorphonuclear neutrophils and induce inflammatory reactions [19].

Current study investigates the *in vitro* antifungal activity against *Candida* of new oximes and their cytotoxicity.

Materials and Methods

Synthesis of Oximes

Whilst 10 mL of deionized water were added in a balloon, 0.52 grams of hydroxylamine hydrochloride, 0.3 g of sodium hydroxide and 5 mmol of the appropriate aldehyde were mixed. The mixture was then subjected to a temperature of 80°C for 4 hours, isolated in ethyl acetate (3x15 mL) and washed with distilled H₂O (3 x 15 mL). The organic

phase was separated, dried with Na_2SO_4 and the solvent was left to evaporate in vacuum. The progress of the reactions was monitored on a Gas Chromatograph every 30 minutes [13,20]. All structures were confirmed by mass spectra (CG-MS). Low resolution mass spectra were obtained on a Shimadzu GCMS-QP2010 spectrometer at 70 eV. Melting points were determined with open capillaries on a Fisatom 430 apparatus and left uncorrected. Oximes are classically prepared by hydroxylamine reflux with a slight excess of carbonyl compound in toluene or ethanol. Finally the pure product is isolated after crystallization or column chromatography. Through an aqueous liquid the oximes are shortly prepared with a small amount of methanol using dichloromethane for the final extraction. The oxime formed was precipitated by water, collected, and re-crystallized from ethanol.

Antifungal agent

Antifungal assay was carried out with compounds shown in Table 1. Ten dilutions of the compounds were prepared with concentrations ranging from 2 to 1000 mg/L in dimethyl sulfur oxide (DMSO), with a fold dilution of 0.5. Table 1 shows the general structure of each compound. Fluconazole was used as a control.

Isolates and culture conditions

Eight strains of *Candida albicans* and six non- *albicans Candida* strains were used to determine the *in vitro* antifungal activity of oximes of six species of oral yeasts: *C. albicans* (8); *C. parapsolisis* (1); *C. lipolytica* (2); *C. tropicalis* (1); *C. famata* (1); *C. glabrata* (1). The strains were obtained from the Laboratory of Oral Microbiology of the Pelotas Dental School at the Federal University of Pelotas RS Brazil. Samples were cultivated aerobically on Sabouraud dextrose-agar with chloramphenicol at $36\pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h.

Antifungal activity

The antifungal assay was conducted according to the CLSI M27-A3 method [21]. After a 24-h *Candida* strains incubation period on fresh Sabouraud dextrose agar, yeasts were harvested and suspended in sterile RPMI culture medium at a turbidity equal to optical density of 0.5 McFarland. The final suspension was adjusted to 1.5×10^8 cell/mL. The solution containing each fungal inoculum was transferred in aliquots of 100 μ L into each well of a sterile 96-well plate that already had a 100 μ L solution containing a dilution of the tested compound. The plates were incubated at 37 °C for 48 hours and readings were performed visually. So that the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) could be evaluated, 20 μ L of each solution, a MIC concentration, were placed into a plate containing Sabouraud dextrose agar. MFCs were defined as the lowest drug dilutions that did not yield growth of yeast colonies (100% killing activity) after 24 h of aerobic incubation at 37 °C [22].

Anti-enzymatic assay

After replanting *C. albicans* strains on Sabouraud dextrose agar with 24 h in advance, they were suspended in 1% sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) solution, with a refraction and visual turbidity equal to 0.5 McFarland units (1.5×10^8 yeast / mL).

For each compound used, they were first diluted in DMSO at a MIC-based concentration, followed by three smaller ones. In the case of each concentration, 20 μ L were emulsified in 1980 μ L of sterile PBS, starting from the highest.

Eight strains of *C. albicans* were prepared in a cell suspension (10^8 yeast/mL) of each strain to determine the effect of oximes on phospholipase and proteinase activity. From the above cell suspension, 0.5 mL were added to tubes containing 2mL PBS (control) and 2 mL PBS/ oximes. This diluted the cell suspension and provided between 10^6 and 10^7 cells/mL in each assay tube. The tubes were then incubated for 30 min at 37 °C. After this brief exposure,

the agent was removed by two cycles of dilution with sterile PBS and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The supernatant was completely decanted and the yeast pellets were re-suspended in 2.5 mL of sterile PBS.

Proteinase activity

Candida proteinase was detected in a culture medium with 2 g bovine serum albumin, 1.45 g yeast nitrogen base, 20 g glucose and 20 g agar per liter of sterile distilled water. Proteinase activity was determined by inoculating 10 μ l aliquots of the yeast suspension (approximately 10^8 yeast cells/mL) onto the surface of the medium. The plates were incubated at 37 °C for two days. Agar opaqueness, corresponding to a proteolysis zone around the colony, indicated degradation of the protein. Zone diameter around the colony was considered a measure of proteinase production. Proteinase activity (Pz) was determined by the ratio of the colony's diameter and that of the proteolytic zone. When Pz equaled 1, no proteinase activity was detected in the strain. Thus, a low Pz indicated high enzyme production [18, 23].

Phospholipase activity

The isolates were screened for their extracellular phospholipase activity by growing them on egg-yolk agar and by measuring the size of precipitation zone, following slightly modified method by Samaranayake et al. (2005). The egg-yolk medium consisted of 65 g Sabouraud dextrose agar (SDA), 57.3 g NaCl, 0.55 g CaCl_2 and 100 mL of egg yolk sterile 50 %, per liter of sterile distilled water. Extracellular phospholipase activity was detected by inoculating 10 μ l aliquots of the yeast suspension (approximately 10^8 yeast cells/ml) onto the surface of the egg-yolk medium. The diameter of the precipitation zone around the colony was measured after incubation at 37 °C for 96 h. Phospholipase activity (Pz value) was determined by the ratio of the colony's diameter and the total diameter of the precipitation

zone. When the Pz equaled 1, no phospholipase activity was detected in the strain. Once more, a low Pz indicated high enzyme production [14,18,23].

Cell Culture

Mouse fibroblasts of the NIH/3T3 cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro RJ Brazil). The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), purchased from Vitrocell Embriolife (Campinas SP Brazil) and Gibco (Grand Island NY USA), respectively. Cells were grown at 37 °C in an atmosphere with 95% humidified air and 5% CO₂, as described previously [24]. The experiments were performed with cells in the logarithmic growth phase.

Determination of cytotoxicity

The viability of NIH/3T3 cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water-insoluble formazan [25]. Cells were then seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 100 μ L in 96-well plates and grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air, for 24 h, before being used in the MTT assay. Cells were incubated with different concentration of oximes [twice (1), once (2), half (3) and quarter of MIC (4)] for 48 h. These compounds were dissolved in DMSO and added to DMEM supplemented with 10% FBS to the desired concentrations. Final DMSO concentration in the culture medium never exceeded 0.5% and a control group exposed to an equivalent concentration of DMSO was evaluated. After incubation, 20 μ L of MTT (5 mg MTT/mL solution) was added to each well. The plates were incubated for an additional 3 h and the medium was discarded. 200 μ L of DMSO were added to each well and the formazan was solubilised on a shaker for 5 min. The absorbance of each

well was read on a microplate reader (Thermo Plate TP-Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) at wavelength 492 nm. The percentage inhibition of cell growth was determined as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100$ [26]. All observations were validated by at least two independent experiments; analyses for each experiment were performed in triplicate.

Statistical analysis

Results of anti-enzymatic activities of the treatment groups and controls were compared; similarly the results of cytotoxicity with Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. Differences among groups were significant at $p < 0.001$. Statistical analyses were performed with SigmaPlot 12.0.

Results

Ten compounds from the oxime class were synthesized and tested against the species *Candida*. Table 1 shows the chemical structure of each compound and yield obtained from the synthesis.

Table 2 shows MIC and MFC results. Chemicals C8 and C10 provided the best results on MIC; compound C1 did not inhibit *Candida albicans*; C2 did not show any inhibition at the concentrations tested. The anti-enzyme tests were conducted only for those compounds which showed anti-*Candida* activity. As the non-*albicans Candida* did not express hydrolytic enzymes, tests were done only for *Candida albicans*, based on MIC concentration and three smaller ones.

Table 3 shows the comparison between Pz results of tests, control and inhibition ratio results in percentage of phospholipase production. C3 compound inhibited phospholipase of *Candida albicans* by an average 25% for the four concentrations. Compound C4 average

inhibition was 45%, C5 44%, C6 50%; C7 already inhibited mean 60% of the phospholipase; for most strains *Candida albicans* provided a 100% inhibition of the enzyme. Compound C8 averagely inhibited 50% in concentration, whereas MIC demonstrated a decrease in their ability to inhibit this enzyme according to concentration decrease. Compound C9 averagely inhibited 50%, whilst C10 inhibited an average 50% for both concentration, higher and an average of 30% for the other. Although this compound showed statistical difference between the two highest concentrations and the two minors, all the other compounds showed no statistical difference among the tested concentrations.

Inhibition tests of hydrolytic enzymes, protease and phospholipase were carried out for eight strains of *Candida albicans* in triplicate. Since the results are expressed as mean of these data, a high value for the standard deviation is justified since *Candida* strains are clinical isolates, some with more susceptibility than others. However, since proteinase tested compounds did not affect the expression of this enzyme, results were omitted.

Cytotoxicity tests were made at four different concentrations, according to MIC for each compound - twice (1), once (2), half (3) and quarter MIC (4). Figure 1 shows cytotoxic activity results. The C4 compound presented the higher cytotoxic effect when compared to the other nine chemicals. It presented an inhibitory ratio of 73% in the lower concentration tested, whereas the C6 chemical was the less cytotoxic, with an inhibitory ratio below 15% in concentrations 1 and 2. Compound C10 inhibited 3T3/NIH cells in a ratio higher than 50%, whereas C8 compound showed a slight cytotoxicity in all concentrations, inhibiting less than 50% of 3T3/NIH cells.

Discussion

The procedure used for the synthesis of oximes agrees with the current trend in the field of chemistry characterized by the principles of green chemistry. Water is employed as

solvent in this reaction. The process is environment friendly since it generates less toxic residues. Furthermore, the solvent has reduced costs when compared to those of other organic compounds. The final synthesis was satisfactory: yields were good and proved the effectiveness of this reaction.

Nine oximes were anti-*Candida* whilst, compounds C8 and C10 which the substituent are in the ortho-position, presented the lowest concentrations of MIC/MFC, and compounds that have the substituent in para-position showed decreased or no activity. Comparing data obtained with the cytotoxicity tests, it could be noticed that compound C6 that not presented substituent in the benzene ring had low cytotoxicity despite its high MIC and MFC concentrations.

Recent studies have suggested an effect of antifungal agents on *Candida*'s virulence factors [14,16,23,27]. Willis et al. (2001) treated diabetic patients with nystatin or fluconazole and found that fluconazole treatment appeared to reduce phospholipase production by *C. albicans* isolates through mouth colonization and infection [16]. Anil and Samaranayake (2003) showed in an *in vitro* study that brief exposure (60 min) of *C. albicans* and *C. tropicalis* to sub-minimal inhibition concentrations of nystatin and amphotericine B significantly reduced the phospholipase activity of both species [23]. Wu et al. (2000), showed that exposure of a fluconazole-susceptible *C. albicans* isolate to fluconazole at sub-MIC concentrations led to a reduction in the specific activity of secreted aspartyl proteinases (Saps). On the other hand, the same treatment of a fluconazole-resistant isolate led to an increase in extracellular proteinase specific activity [27]. Kadir et al. (2007) investigated the phospholipase activity of 10 *C. albicans* isolates (which produced phospholipase at different levels) exposed to two sub-therapeutic concentrations of chlorhexidine for the short time of 30 min. A significant reduction in the mean value of phospholipase production was shown [14].

Our results showed in most cases, a great ability to inhibit phospholipase expression with 50% reduction. Regardless of their concentrations, the most tested compounds have the same capacity to inhibit the expression of phospholipase. The latter is highly advantageous since some of the higher concentrations showed slight cytotoxicity and had the same effect in inhibiting phospholipase in non cytotoxic concentrations.

Furthermore, the secretion of extra cellular phospholipases is considered a key factor that aids the invasion of the host's mucosal epithelia. Phospholipases generally catalyze the hydrolysis of phospholipids, which are the major components of all cell membranes [28]. Current results showed a great reduction in phospholipase production which suggests that compounds of this class may interfere with the invasion of the host and disease growth.

Conclusions

Studies with new molecules in inhibiting virulence factors of *Candida*, as proteinase and phospholipase are recent, and seeking to meet a growing demand in medical mycology. The oximes examined showed less fungicidal activity than fluconazole, but interfered significantly in expression of phospholipase. Some oximes included in this study can be a good matrix for the development of novel antifungal compounds.

Acknowledgements

Current research was funded CNPq, CAPES and UFPel.

References

1. Ramage GS, Milligan DF, Lappin L et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol.* 2012;3:220–8.

2. Kanafani ZA and Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. Clin Infect Dis. 2008;46:120–8.
3. Cowen LE. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. Nat Rev Microbiol. 2008;6:187–98.
4. Stefani HA, Oliveira CB, Almeida RB et al. Dihydropyrimidin-(2*H*)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. Eur. J. Med. Chem. 2012;41:513–18.
5. Vasconcelos A, Oliveira PS, Ritter M et al. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2*H*)-ones promoted by naturally occurring organic acids. J. Biochem. Mol. Toxic. 2012;26:155–61.
6. Flores AFC, Pizzuti L, Piovesan LA et al. Efficient synthesis of new 1-alkyl (aryl)-5-(3,3,3-trihalo-2-oxopropylidene)-1*H*-pyrrol-2(5*H*)-ones. Tetrahedron Lett. 2010;51:4908–10.
7. Silva FAN, Galluzzi MP, Albuquerque B et al. Ultrasound irradiation promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles. Lett Drug Des Discov. 2009;6:323–26.
8. Silva FAN, Pizzuti L, Quina FH et al. Antioxidant Capacity of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles. Lett Drug Des Discov. 2010;7:657–60.

9. Prushan MJ, Addison AW, Butcher RJ. Pentadentate thioether-oxime macrocyclic and quasi-macrocyclic complexes of copper (II) and nickel (II) Inorg. Chim. Acta. 2000;300:992–1003.
10. Karatas I, Uçan HI. The synthesis of biphenylglyoxime and bis(henylglyoxime) and their complexes with Cu(II), Ni(II) and Co(II). Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem. 1998;28:383.
11. Canpolat E, Kaya M. Synthesis and formation of a new vic-dioxime complexes. J. Coord. Chem. 2005;58:1217
12. Sikharulidze MI, Nadaraia NSh, Kakhabrishvili ML. et al. Synthesis and Biological Activity of Several Steroidal Oximes. Chem Nat Compd. 2010;46:494–95.
13. Li J-T, Li X-L, LI T-S. Synthesis of oximes under ultrasound irradiation, Ultrason. Sonochem. 2006;13:200.
14. Kadir T, Gümrü B, Uygün-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. Arch Oral Biol. 2007;52:691–96.
15. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. Microbiol Mol Biol R. 2003;6:400–28.

16. Willis AM, Coulter WA, Fulton CR et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo. 2001;91:317–21.
17. Fonzi WA. The protein secretory pathway of *Candida albicans*. Mycoses. 2009;52:291–303.
18. Abaci O. Investigation of Extracellular Phospholipase and Proteinase Activities of *Candida* Species Isolated from Individuals Denture Wearers and Genotypic Distribution of *Candida albicans* Strains. Curr Microbiol. 2011;62:1308–14.
19. Barros LM, Boriollo MF, Alves AC et al. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. Arch Oral Biol. 2008;53:1172–8.
20. Khoramabadi-Zad A, Azadmanesh M, Rezaee A. Simple efficient and green synthesis of oximes under ultrasound irradiation, S. Afr. J. Chem. 2010;63:192.
21. Clinical laboratory standards institution. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. Wayne, Pa.: 2008.
22. Duval AR, Carvalho PH, Soares MC et al. 7-Chloroquinolin-4-yl arylhydrazones derivatives: synthesis and antifungal activity. Sci World J. 2011;11:1489–95.

23. Anil S, Samaranayake LP. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Chemotherapy*. 2003;49:243–7.
24. Nedel F, Begnini K, Carvalho PH et al. Antiproliferative Activity of Flower Hexane Extract Obtained from *Mentha spicata* Associated with *Mentha rotundifolia* Against the MCF7, KB, and NIH/3T3 Cell Lines. *J Med Food*. 2012;15:955–8.
25. Henn S, Nedel F, de Carvalho RV et al. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22:1797–802.
26. Nedel F, Campos VF, Alves D et al. Substituted diaryl diselenides: cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. *Life Sci*. 2012;91:345–52.
27. Wu T, Wright K, Hurst SF et al. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Ch*. 2000;44:1200–8.
28. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1995;63:1993–98.

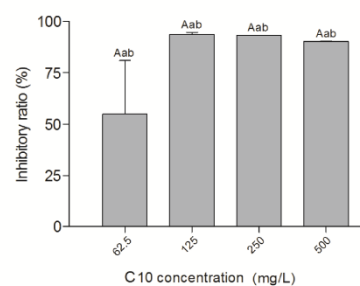
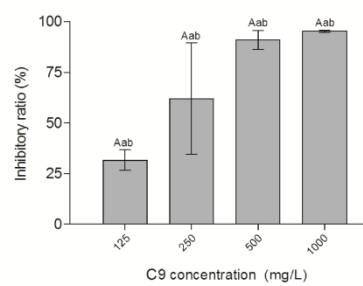
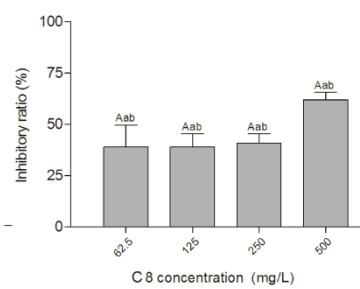
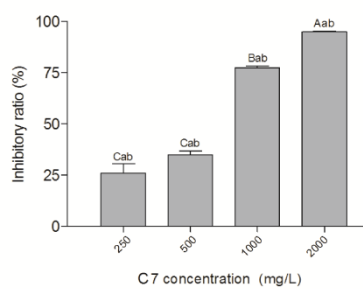
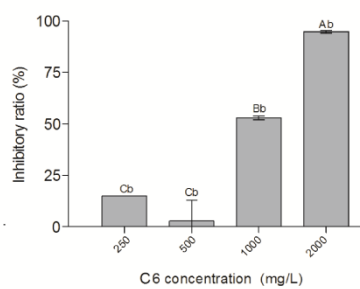
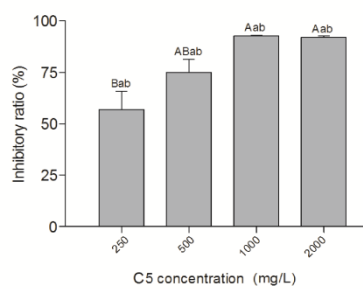
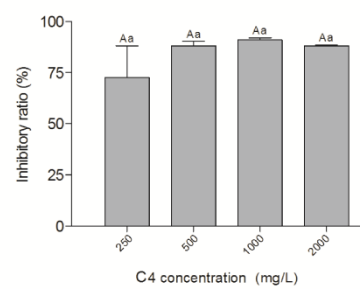
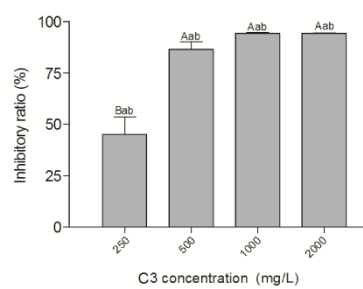
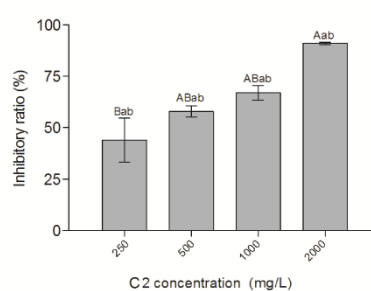
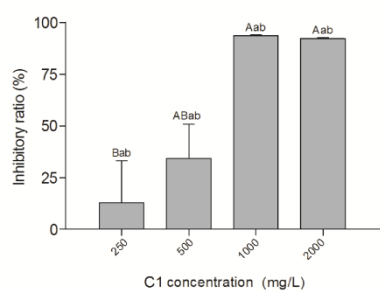


Figure 1. Effect of different types and concentrations of oximes following exposure for 48 h on the inhibition of NIH/3T3 cell line. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Uppercase letters indicate significant differences in the concentrations used and lowercase letters indicate significant differences between the types of oximes tested. $p < 0.05$ was considered significant by Tukey's test.

Table 1. The chemical structure of each compound tested against the species *Candida* and synthesis yield.

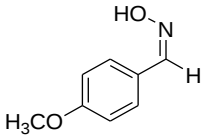
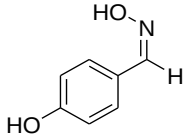
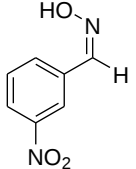
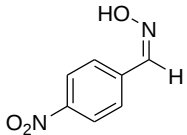
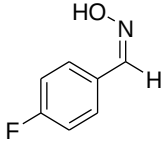
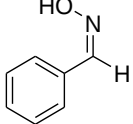
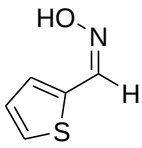
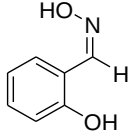
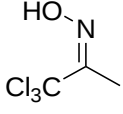
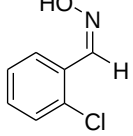
Compound	Substance	MF	MW (g/mol)	Synthesis Yield (%)
C1		C ₈ H ₉ NO ₂	151.06	65.00
C2		C ₇ H ₇ NO ₂	137.05	67.00
C3		C ₇ H ₆ N ₂ O ₃	166.04	61.41
C4		C ₇ H ₆ N ₂ O ₃	166.04	63.87
C5		C ₇ H ₆ FNO	139.04	76.94
C6		C ₇ H ₇ NO	121.05	75.23
C7		C ₅ H ₅ NOS	127.01	68.24
C8		C ₇ H ₇ NO ₂	137.05	87.00
C9		C ₃ H ₄ Cl ₃ NO	174.94	65.00
C10		C ₇ H ₆ ClNO	155.01	68.00

Table 2. Screening of oximes against strains of *Candida albicans* and non-*Candida albicans*.

Compound	MFC/MIC (mg/L)					
	<i>C. albicans</i> (n=8)	<i>C. parapsilosis</i> (n=2)	<i>C. famata</i> (n=1)	<i>C. glabrata</i> (n=1)	<i>C. lipolytica</i> (n=1)	<i>C. tropicalis</i> (n=1)
C1	>1000/>1000	500/500	1000/1000	1000/1000	1000/1000	500/250
C2	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
C3	1000/1000	1000/500	500/500	500/500	500/500	500/500
C4	1000/1000	500/500	500/500	500/500	500/500	500/500
C5	1000/1000	500/500	500/500	1000/1000	1000/1000	1000/500
C6	1000/500	500/250	1000/500	1000/500	1000/500	500/500
C7	1000/750	500/500	500/500	500/500	500/500	500/500
C8	250/250	500/250	500/250	500/250	500/250	500/500
C9	500/500	1000/500	1000/500	1000/500	1000/500	1000/500
C10	125/125	250/250	250/250	500/500	500/250	250/250
Fluconazole	16/16	2/2	4/4	2/2	8/8	2/2

Rates are the mean of at least three determinations.

Table 3. Comparison between Pz results of tests, control and inhibition ratio results in percentage for phospholipase production.

Oxime	Concentration (mg/L)	Control Pz (Mean $\pm$ SD)	Pz (Mean $\pm$ SD)	Inhibition Ratio (%)
C3	1000	0.59 $\pm$ 0.11	0.69 $\pm$ 0.11	25.09 $\pm$ 15.54 ^a
	500	0.59 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.11	22.02 $\pm$ 14.84 ^a
	250	0.62 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.08	33.74 $\pm$ 8.64 ^a
	125	0.67 $\pm$ 0.14	0.76 $\pm$ 0.12	31.23 $\pm$ 11.41 ^a
C4	1000	0.61 $\pm$ 0.11	0.78 $\pm$ 0.13	45.55 $\pm$ 12.22 ^a
	500	0.67 $\pm$ 0.12	0.77 $\pm$ 0.10	50.7 $\pm$ 13.54 ^a
	250	0.65 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.10	45.7 $\pm$ 21.36 ^a
	125	0.67 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.09	47.0 $\pm$ 20.66 ^a
C5	1000	0.69 $\pm$ 0.12	0.83 $\pm$ 0.07	44.54 $\pm$ 13.0 ^a
	500	0.70 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.06	41.9 $\pm$ 14.55 ^a
	250	0.63 $\pm$ 0.16	0.79 $\pm$ 0.10	44.00 $\pm$ 10.9 ^a
	125	0.57 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.08	36.00 $\pm$ 19.1 ^a
C6	1000	0.70 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.07	46.4 $\pm$ 5.13 ^a
	500	0.69 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.09	37.9 $\pm$ 22.1 ^a
	250	0.65 $\pm$ 0.12	0.82 $\pm$ 0.13	53.43 $\pm$ 23.4 ^a
	125	0.65 $\pm$ 0.12	0.81 $\pm$ 0.13	50.63 $\pm$ 24.74 ^a
C7	500	0.63 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.10	54.98 $\pm$ 17.63 ^a
	250	0.64 $\pm$ 0.10	0.84 $\pm$ 0.12	67.4 $\pm$ 27.11 ^a
	125	0.65 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.10	55.21 $\pm$ 29.58 ^a
	62.5	0.65 $\pm$ 0.11	0.85 $\pm$ 0.10	58.75 $\pm$ 27.98 ^a
C8	250	0.69 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.11	50.44 $\pm$ 31.5 ^a
	125	0.68 $\pm$ 0.08	0.76 $\pm$ 0.09	34.7 $\pm$ 18.3 ^a
	62.5	0.65 $\pm$ 0.09	0.74 $\pm$ 0.09	25.25 $\pm$ 10.2 ^a
	31.2	0.64 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.11	9.47 $\pm$ 14.16 ^a
C9	500	0.70 $\pm$ 0.07	0.83 $\pm$ 0.10	46.6 $\pm$ 29.84 ^a
	250	0.74 $\pm$ 0.10	0.81 $\pm$ 0.4	48.05 $\pm$ 26.9 ^a
	125	0.64 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.06	53.43 $\pm$ 23.4 ^a
	62.5	0.65 $\pm$ 0.12	0.75 $\pm$ 0.08	50.63 $\pm$ 24.74 ^a
C10	125	0.74 $\pm$ 0.11	0.81 $\pm$ 0.04	52.57 $\pm$ 13.18 ^a
	62.5	0.74 $\pm$ 0.10	0.81 $\pm$ 0.04	48.92 $\pm$ 12.28 ^a
	31.2	0.64 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.06	30.17 $\pm$ 7.28 ^b
	15.6	0.68 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.06	25.84 $\pm$ 12.44 ^b

Different lower case letters indicate statistic difference between different concentrations.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados e discutidos nesse estudo foram elaboradas as seguintes considerações:

1. Os ácidos graxos e as oximas apresentaram atividade anti-*Candida* nos testes de microdiluição em caldo. O ácido graxo que apresentou o melhor resultado no MIC contra espécies de *Candida* foi o ácido láurico. E as oximas que apresentaram menores concentrações inibitórias foram a C8 e a C10.
2. Os metil e etil ésteres derivados não apresentaram atividade para nenhuma das espécies de *Candida* nas concentrações testadas.
3. Para os ácidos graxos, a inibição da enzima fosfolipase foi mais significativa do que a inibição da produção de proteinase, destacando-se o ácido caprílico.
4. Os resultados dos ensaios enzimáticos das oximas mostraram uma grande redução na produção de fosfolipase, que sugere que os compostos desta classe podem interferir na invasão do hospedeiro e no desenvolvimento da doença.
5. As oximas não alteraram significativamente a expressão de proteinases.
6. Os ácidos graxos testados mostraram uma viabilidade celular maior que 80% nas concentrações de MIC, e de 100% em concentrações de atividade antienzimática.
7. As oximas apresentaram uma viabilidade celular de aproximadamente 50% nas concentrações de MIC e de atividade enzimática.
8. A utilização potencial dos ácidos graxos e das oximas deve ser considerada para futuros estudos sobre o tratamento de candidíase.

6 REFERÊNCIAS

ALI, M. H.; GREENE, S.; WIGGIN, C. J.; KHAN, S. Oxidative Cleavage of Oximes with Silica-Gel-Supported Chromic Acid in Nonaqueous Media. **Synthetic Communications**, v.36, p.1761-1767, 2006.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI T. I. E.; CONSOLARO M. E. L.; Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ANIL. S. & SAMARANAYAKE L. P. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Chemotherapy**, v. 49, p. 243-247, 2003.

AZEVEDO IZIDORO A. C. S, et al. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. **Archives of Oral Biology**, 2011.

BARROS, L. M.; BORIOLO M. F.; ALVES A. C.; KLEIN M. I.; GONÇALVES R. B. & HÖFLING J. F. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. **Archives of Oral Biology**, v.53, p.1172-1178, 2008.

BARRETT-BEE K, HAYES Y, WILSON RG, RYLEY JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **Journal of General Microbiology**. v.131, p.1217-1221, 1985.

BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J. H.; STEINGRÍMSSON, O. L.; HALLDOR T. H. In Vitro Killing Of *Candida Albicans* By Fatty Acids And Monoglycerides. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.45, n.11, p. 3209-3212, 2001.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., MCCOY, K. D., WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, 1996, 4, p. 14-9.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33(5); p.437-442, 2000.

CANPOLAT. E. K. M. Synthesis and formation of a new vic-dioxime complexes. **Journal of Coordination Chemistry**. v.58, p.1217, 2005.

CARDOSO, A. L. Estudo cinético das reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Lewis e de Bronsted para produção de biodiesel. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa** . Viçosa, MG, 2008.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of nutral red anda mino black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**. V.17,p.1259-1264. 1996.

COSTA, E. M. M. B. et al. Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 38; p.173-180, 2003.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbioloy**, v.6, p.187-198, 2008.

DESBOIS, A. P. & SMITH, V. J. MINI-REVIEW: Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.85, p.1629–1642, 2010.

DISMUKES, W. E.; P. G. PAPPAS AND J. D. SOBEL, **Clinical Mycology**. Prin USA University, New York. 2003.

DUVAL, A. R.; CARVALHO, P. H.; SOARES, M. C.; GOUVÊA, D. P.; SIQUEIRA, G.M.; LUND, R. G.; CUNICO, W. 7-Chloroquinolin-4-yl arylhydrazone derivatives: synthesis and antifungal activity. **The Scientific World Journal**, v.11, p.1489–1495, 2011.

FLORES, A. F. C.; PIZZUTI, L.; PIOVESAN, L. A.; FLORES, D. C.; MALAVOLTA, J. L.; PEREIRA, C. M. P. Efficient synthesis of new 1-alkyl(aryl)-5-(3,3,3-trihalo-2-oxopropylidene)-1H-pyrrol-2(5*H*)-ones. **Tetrahedron Letters**, v.51 p. 4908-4910, 2010.

FONZI, W. A. The protein secretory pathway of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.52, p.291-303, 2009.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviewers**. v.13, p.122–143, 2000.

HUANG, C. B.; ALIMOVA, Y.; MYERS, T. M.; EBERSOLE, J. L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**. v.56(7) p. 650-654, 2011.

HUBE, B. Extracellular Proteases of Human Pathogenic Fungi. **Contributions to Microbiology**. v. 5, p. 126-137, 2000.

HUBE, B. & NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v.147, p.1997-2005, 2001.

HOBUSS, C. B.; VENZKE, D.; PACHECO, B. S. ; SOUZA, A.; SANTOS, M. A. Z.; MOURA, S.; QUINA, F. H.; FIAMETTI, K. G.; OLIVEIRA, J. V.; PEREIRA, C. M. P. Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.19, p.387-389, 2012.

IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G .T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS, J. R.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Evidence implicating

phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v.63, p.1993-1998, 1995.

KADIR, T.; GÜMRÜ, B.; UYGUN-CAN, B.; Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Archives of Oral Biology**. v.52, p.691-696, 2007.

KANAFANI, Z. A. & PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**. v.46 p.120-128, 2008.

KARATAS, I. & UÇAN, H. I. The synthesis of biphenylglyoxime and bis(henylglyoxime) and their complexes with Cu(II), Ni(II) and Co(II). **Synthesis and Reactivity i Inorganic and Metal-Organic Chemistry**. v.28 p. 383, 1998.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE,A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S. & GADHWE, S.; The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 2012.

KIASAT, A. R.; KAZEMI, F.; NOURBAKHSH, K. A Clean Conversion of Carbonyl Compounds to Oximes Using Silica Gel Supported Hydroxylamine Hydrochloride. **Synthetic Communications**, v. 179, p.1193-1196, 2004.

KOULAOUZIDOU, E. A.; MARGELOS, J.; BELTES, P.; KORTSARIS, A. H. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. **Journal Endodontiscs**. v.25(1), p.21-23. 1999.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier; p. 998-1067, 2002.

LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, p.137; 2004.

LU, H. & TONGUE, P. J. Inhibitor of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. **Accounts of Chemical Research**, v. 41 n.1, p.11-20, 2008.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; AGUIRRE, J. M.; QUINDO'S, G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers, **Mycoses**, v.54, p.10-14, 2009.

MARTINS MD, MARQUES MM, BUSSADORI SK, MESQUITA-FERRARI RA, PAVESI VCS, WADT NS, et al. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConScientiae Saúde**. 80(1):99-104. 2009.

MISHRA, M .M. et al. Pathogenicity and drug resistance in candida albicans and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. v.54; p.201-235, 2007.

MOSSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**. v.65, p.55-63. 1983.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 6; p. 400-428, 2003.

NEVILE, B. W. et al. **Patologia oral & Maxilofacial**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

PÄRNÄNEN, P. *Candida* proteinases in the degradation of oral mucosal tissue components associated with *Candida* invasion. **Academic Dissertation**, Institute of dentistry, University of Helsinki, Finland, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39 p.3254-3259, 2001.

PRUSHAN, M. J.; ADDISON, A. W.; BUTCHER, R. J. Pentadentate thioether-oxime macrocyclic and quasi-macrocyclic complexes of copper(II) and nickel(II) **Inorganica Chimica Acta**, v.300 p.992-1003, 2000.

RAMAGE, G.; MILLIGAN, S.; LAPPIN, D. F.; SHERRY, L.; SWEENEY, P.; WILLIAMS, C.; BAGG, J. & CULSHAW, S. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. **Frontiers Microbiology**. v.3, p. 220; 2012.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. P.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62 n.3 p.597-635, 1998.

ROGERO SO, LUGÃO AB, IKEDA TI, CRUZ AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** 6(3):317-20. 2003.

SIKHARULIDZE, M. I.; NADARAIA, N. S. H.; KAKHABRISHVILI, M. L.; BARBAKADZE, N. N.; MULKIDZHANYAN, K. G. Synthesis and Biological Activity of Several Steroidal Oximes. **Chemistry of Natural Compounds**, v.46, p.494-495, 2010.

SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, F. GALLUZZI, M. P.; ALBUQUERQUE, B.; PIZZUTI, L.; GRESSLER, V.; RIVELLI.; D. P. BARROS, S. B. M.; PEREIRA, C. M. P. Ultrasound irradiation

promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles. **Letters in Drug Design & Discovery**. v.6, p.323-326, 2009.

SILVA, F.; PIZZUTI, L.; QUINA, F. H.; SOUZA, S. P.; ROSALES, P. F.; SIQUEIRA, G. M.; PEREIRA, C. M. P.; BARROS, S. B. M.; RIVELLI, D. P. Antioxidant Capacity of 2-(3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-phenylthiazoles. **Letters in Drug Design & Discovery**. v.7, p.657-660, 2010.

STEFANI, H. A.; OLIVEIRA, C. B.; ALMEIDA, R. B.; PEREIRA, C. M. P.; BRAGA, R. C.; CELLA, R. BORGES, V. C.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.41 p.513-518, 2012.

THOMAS, G. **Química Medicinal: Uma Introdução**. Rio de Janeiro, Guanabara koogan. p.1222-1223. 2003.

TRABULSI, L. R. ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4^a ed. Rio de Janeiro, Atheneu. p.451. 2005.

VALADARES M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3(2), p.93-98. 2006.

VASCONCELOS, A.; OLIVEIRA, P. S.; RITTER, M.; FREITAG, R. A.; ROMANO, R. L.; QUINA, F. H.; PIZZUTI, L.; PEREIRA, C. M. P.; STEFANELLO, F. M.; BARSCHAK, A. G. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v. 26 p.155-161, 2012.

WEYERMANN, J., LOCHMANN, D., ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, 2005, 288, p. 369-76.

WILLIS, A. M.; . COULTER, W. A; FULTON, C. R.; HAYES, J. R.; BELL, P. M.; LAMEY, P. J. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. ***Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics***. v.91, p.317-321; 2001.

WU, T.; WRIGHT, K.; HURST, S. F. et al. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v.44; p.1200–1208, 2000.

ANEXO 1 – METODOLOGIAS

Metodologia

Foram realizados para todos reagentes, os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de acordo com o método CLSI (2008).

Foram avaliados influência desses ácidos graxos contra fatores de virulência de *Candida* spp., como inibição da produção de exoenzimas (fosfolipase e proteinase) de acordo com a metodologia proposta por Kadir e colaboradores (KADIR, et al., 2007).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com a ISO 10993-5:2009. Avaliação biológica de dispositivos médicos Parte 5: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* (MTT).

1 Reagentes

Os ensaios foram realizados com os ácidos graxos de cadeia média: [octanóico (C8), cáprico (C10), láurico (C12)], e de cadeia longa [ácido mirístico (C14)], da marca Aldrich, e com os derivados ésteres metílicos e etílicos sintetizados por Hobbus et al (2012). E com dez compostos da classe das oximas, sintetizados pelo nosso grupo. A estrutura química, a fórmula molecular (FM) e o peso molecular (PM), dos ácidos graxos e ésteres é demonstrada na Tabela 1, e das oximas na Tabela 2.

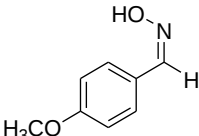
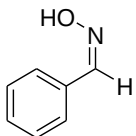
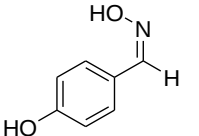
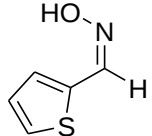
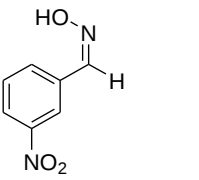
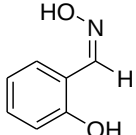
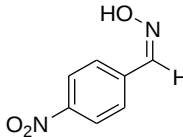
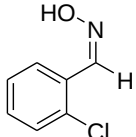
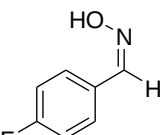
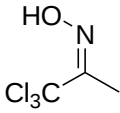
Para ambas as classes de compostos foram feitos testes para verificar em qual solvente melhor se diluiriam. Os solventes testados foram água, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO). Os ácidos graxos e ésteres foram melhor solúveis em etanol, partindo-se de uma concentração de 0,5 mg/mL e as oximas em DMSO, partindo-se de uma concentração de 0,1mg/mL.

Os compostos utilizados, foram diluídos no solvente apropriado e divididos em nove concentrações filhas com valores em progressão geométrica de razão 0,5.

Tabela 1. Estrutura química dos ácidos graxos, metil e etil ésteres derivados com potencial atividade biológica.

Estrutura	FM PM (g/mol)	
	$C_8H_{16}O_2$ 144,21	Ácidos Graxos
	$C_{10}H_{20}O_2$ 172,26	
	$C_{12}H_{24}O_2$ 200,32	
	$C_{14}H_{28}O_2$ 228,37	
	$C_9H_{18}O_2$ 158,24	Metil ésteres
	$C_{11}H_{22}O_2$ 186,29	
	$C_{13}H_{26}O_2$ 214,34	
	$C_{15}H_{30}O_2$ 242,40	
	$C_{10}H_{20}O_2$ 172,26	Etil ésteres
	$C_{12}H_{24}O_2$ 200,32	
	$C_{14}H_{28}O_2$ 228,37	
	$C_{16}H_{32}O_2$ 256,42	

Tabela 2. Fórmula estrutural e molecular de compostos da classe das oximas, com potencial atividade biológica.

Estrutura	FM	PM (g/mol)	Estrutura	FM	PM (g/mol)
	$C_8H_9NO_2$	151,06		C_7H_7NO	121,05
	$C_7H_7NO_2$	137,05		C_5H_5NOS	127,01
	$C_7H_6N_2O_3$	166,04		$C_7H_7NO_2$	137,05
	$C_7H_6N_2O_3$	166,04		C_7H_6ClNO	155,01
	C_7H_6FNO	139,04		$C_3H_4Cl_3NO$	174,94

2 Atividade Antifúngica

2.1 Leveduras

Todos os testes foram realizados com 14 amostras de *Candida* spp. Sendo 8 amostras de *Candida albicans* e 6 amostras de *Candida não albicans*, fornecidas pelo laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, isoladas da cavidade oral de pacientes atendidos na Unidade de Diagnóstico Estomatológico e armazenadas sob congelamento em freezer a -80°C na micoteca do Laboratório de Microbiologia Oral.

2.2 Determinação da CIM e CFM – Técnica de Microdiluição em Caldo

A determinação da atividade fungicida e fungistática foram determinadas através do método CLSI (2008). Os microrganismos foram repicados 24h antes e diluídos em 5mL solução salina estéril, ajustada à escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ microrganismos/mL).

Para cada concentração dos compostos, partindo-se da mais alta, 20 μ L foram emulsionados em 1980 μ L de RPMI estéril.

Foram transferidos alíquotas de Pipete 100 μ L do produto a ser testado, nas concentrações de 1 a 10 em cada poço das placas de 96 poços estéreis e foram adicionados 100 μ L da solução contendo cada inóculo do fungo. Os poços 11 e 12 continham o controle positivo (Pipete 100 μ L de meio de cultura RPMI + Pipete 100 μ L do produto a ser testado) e controle negativo (Pipete 100 μ L de meio de cultura RPMI + Pipete 100 μ L da solução contendo cada isolado). As placas foram incubadas a 37°C por 96 horas. As leituras foram feitas visualmente, comparando o crescimento da levedura na poços com os poços que tinham o controle positivo (cavidade 11). Para avaliar a concentração de fungicida mínima (CFM), Pipete 20 μ L de cada solução que foi considerada uma concentração MIC, foram semeadas em uma placa contendo 9 milímetros Sabouraud Dextrose Agar. A CFM foi definida como a menor diluição da droga que não rendeu um crescimento de colônias de leveduras (100% de atividade matar) após 24h de incubação aeróbia a 37 ° C.

3 Teste de Atividade Antienzimática

As cepas de *C. albicans* com atividade de fosfolipase e proteinase, após repique em Ágar Sabouraud com 24h de antecedência, foram suspensas em 5 mL de PBS (Tampão fosfato salino) estéril, com turbidez e refração visual igual a 0,5 unidade de McFarland ($1,5 \times 10^8$ microrganismos/mL).

Para os testes de atividade antienzimática foram testados quatro concentrações de cada composto que apresentou atividade antifúngica, sendo elas o MIC e três concentrações menores. Para cada concentração, partindo-se da mais alta, 20 μ L foram emulsionados em 1980 μ L de PBS estéril.

Para a exposição do microrganismo ao agente foram adicionados 10% (0,5mL) do inóculo a solução PBS/agente, sendo então esse conjunto incubado por

30 min. Após a incubação o complexo agente-microrganismo foi centrifugado a 3000 rpm x 10min, retirado o sobrenadante (90%), e lavado com mais 2 mL PBS estéril, sendo esse processo repetido duas vezes a concentração do agente é reduzida em aproximadamente 100 vezes, ao final o *pellet* restante deve ser diluído em 2 mL de PBS estéril e agitado em Vórtex. Feita a diluição, será colocado 20 µL de cada amostra no meio de teste. Todas as amostras serão testadas em triplicata.

3.1 Proteinase:

Para avaliação da atividade de proteinase, foi utilizado um meio de cultura contendo os seguintes produtos, nessas medidas: 2g de albumina sérica bovina; 1,45g de base nitrogenada para leveduras; 20g de glicose e 20g de ágar-ágar por litro de água destilada estéril.

3.2 Fosfolipase:

Para avaliação da atividade de fosfolipase, foi utilizado um meio de cultura contendo os seguintes produtos, nessas medidas: 57,3g de cloreto de sódio; 0,55g de cloreto de cálcio e 100ml de gema de ovo estéril 50% por litro de água destilada estéril.

As placas foram incubadas à 37°C por 48 horas para proteinase e por 72 horas para fosfolipase. A atividade enzimática será determinada pela formação de um halo em torno da colônia, e medida em função da razão diâmetro da colônia/diâmetro da colônia + zona de precipitação, de acordo com o método descrito por Price et al.(1982).

4 Ensaio de Citotoxicidade

4.1 Linhagem Celular

Foram também realizados os testes para avaliar a citotoxicidade dos compostos frente a linhagem de células de origem mesenquimal fibroblastos 3T3/NIH (ácidos graxos) e L-929 (oximas) usando a metodologia proposta pela ISO 10993-5:2009. Avaliação biológica de dispositivos médicos Parte 5: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* (MTT).

4.2 Diluições

Série de diluições foram preparadas para cada composto de acordo com o MIC obtido. Para os ácidos graxos, partindo de concentrações 10 vezes maior que o MIC e a partir desta foram feitas quatro diluições com razão de 0,1. E para as oximas 4 vezes maior que o MIC e a partir desta foram feitas quatro diluições com razão de 0,5.

4.3 Método Colorimétrico com MTT

O meio de cultura foi obtido a partir GIBCO (Grand Island, NY, EUA). Todos os reagentes outros foram da Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Os compostos foram diluídos em meio modificado Dulbecco Águia (DMEM). O meio de cultura celular DMEM será suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% l-glutamina, penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Fibroblastos de rato da linhagem celular imortalizada 3T3/NIH e L-929 foram mantidos como uma cultura de células em DMEM e incubadas a 37 °C em atmosfera húmida de 5% de CO₂ no ar.

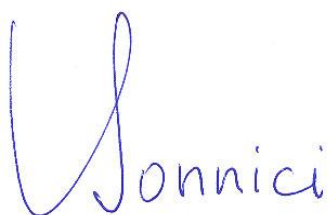
A 3 - (4,5-dimetil-2-il) -2,5-brometo de difeniltertrazolio ensaio (MTT) será usada para avaliar a função metabólica celular por atividade desidrogenase mitocondrial. Fibroblastos de rato 3T3/NIH ou L-929 (2×10^4 /cavidade) serão mantidas em DMEM em placas de 96 poços por 24 h. Citotoxicidade produzida por diferentes diluições dos compostos foi avaliada em 24 e 48h vez célula-exposição. Depois de retirar o produto de teste, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS). De 200 mL de meio com 20 mL de solução de MTT (5 mg / mL de MTT em PBS) foi adicionado a cada poço. Após 5 h de incubação a 37 °C no escuro, a precipitação azul foi extraída da mitocôndria usando DMSO 200 mL/poço em um agitador por 5 min a 180°. A densidade óptica a 540 nm foi determinada espectrofotometricamente. Todos os experimentos foram realizados três vezes.

ANEXO 2 – Certificado de Revisão do inglês – Artigo 1

To the Editorial Board of International Journal of Antimicrobial Agents

This is to certify that the English version of the paper “Aliphatic Fatty Acids and Esters: Inhibition of growth and exoenzyme production of *Candida* and their cytotoxicity *in vitro*” by Juliana L. S. Souza, Pedro H. A. Carvalho, Bruna S. Pacheco, Cláudio M. P. Pereira, Adriana F. da Silva and Rafael G. Lund, was revised and corrected by the undersigned.

Maringá PR Brazil, 21 February 2013.

A handwritten signature in blue ink, reading "Bonnici". The signature is stylized, with a large, looped initial 'B'.

Dr. Thomas Bonnici

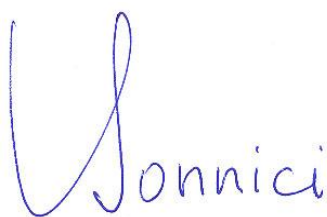
I.D. card 563 250

Department of English, State University of Maringá, Maringá PR Brazil.

ANEXO 3 – Certificado de Revisão do inglês – Artigo 2**To the Editorial Board of the *Mycopathologia***

This is to certify that the English version of the paper “Antifungal susceptibility, exoenzyme production and cytotoxicity of novel oximes against *Candida*”, by J. L. S.Souza; P. H. A. Carvalho; M. Ritter, F. Nedel; C. M.Pereira; R.G. Lund was revised and corrected by the undersigned.

Maringá PR Brazil, 21 February 2013.

A handwritten signature in blue ink, reading 'U. Bonnici', with a large 'U' and a stylized 'B'.

Dr. Thomas Bonnici

I.D. card 563 250

Department of English, State University of Maringá, Maringá PR Brazil.

ANEXO 4 – Comprovante de Submissão do Artigo 1

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Antimicrobial Agents
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
Feb 22, 2013	Feb 22, 2013	Submitted to Journal

Title: Aliphatic Fatty Acids and Esters: Inhibition of growth and exoenzyme production of Candida, and their cytotoxicity in vitro

Article Type: Original Article

Keywords: Fatty acids, Antifungal agents, Candida, Exoenzyme production, Cytotoxicity, in vitro assays

Corresponding Author: Dr. Rafael Guerra Lund, Ph.D., M.D., D.D.S.

Corresponding Author's Institution: Federal university of Pelotas, Pelotas Dental School

First Author: Juliana Leitzke S Souza, M.D., D.D.S.

Order of Authors: Juliana Leitzke S Souza, M.D., D.D.S.; Adriana F da Silva, Ph.D., M.D., D.D.S. ; Pedro Henrique A Carvalho, D.D.S.; Bruna S Pacheco, D.D.S.; Cláudio Martin P Pereira, Ph.D., M.D., D.D.S.; Rafael Guerra Lund, Ph.D., M.D., D.D.S.

ANEXO 5– Comprovante de Submissão do Artigo 2

Mycopathologia

Antifungal susceptibility, exoenzyme production and cytotoxicity of novel oximes against *Candida*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Antifungal susceptibility, exoenzyme production and cytotoxicity of novel oximes against <i>Candida</i>
Article Type:	Original Research
Keywords:	Oximes; antifungal agents; proteinase; phospholipase; cytotoxicity.
Corresponding Author:	Rafael Guerra Lund, Ph.D. Federal University of Pelotas Pelotas, Rio Grande do Sul BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Pelotas
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Juliana L S Souza, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Juliana L S Souza, M.D.
	Fernanda Nedel, Ph.D
	Pedro Henrique A Carvalho, D.D.S
	Marina Ritter, M.D.
	Cláudio M P Pereira, Ph.D
	Rafael Guerra Lund, Ph.D.