

Composto sintético: ação inibitória contra *Streptococcus mutans*

JORGE, C. C.¹; ALEIXO, A.A.¹; HERRERA, K.M.S.¹; MAGALHÃES, J. T.¹; ALVES, R.J.²; FERREIRA, J. M. S.¹

RESUMO

A prevalência de microorganismos multirresistentes tem aumentado nas últimas décadas. Diante disso, a prospecção de novos antimicrobianos, através de compostos químicos sintetizados, representa uma alternativa eficaz no combate às infecções. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana dos compostos DT12, PEG e 19 contra a bactéria *Streptococcus mutans*, principal agente causador da cárie dentária e de outras infecções oportunistas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo. Os compostos foram testados nas concentrações que variaram de 800 µmol/L a 6,25 µmol/L. Estreptomicina 1,0 g/L e dimetilsulfóxido (DMSO) 20% foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. O composto 19 apresentou CIM de 100 µmol/L. Dessa forma, os resultados podem apresentar subsídios para estudos posteriores de compostos sintéticos glicídicos e aromáticos como agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: Antimicrobianos, *Streptococcus mutans*, Multirresistência.

INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans faz parte da flora comensal da cavidade oral e pode desempenhar um importante papel na patogênese da cárie dental.¹ Esta bactéria pode aderir e acumular-se na superfície do dente com polissacarídeos extracelulares produzidas por glucosiltransferases (GTFs) a partir da sacarose². Além disso, estas bactérias podem metabolizar os

açúcares da dieta para ácidos orgânicos e suportar variações rápidas do pH³. Dessa forma, a *S. mutans* pode colonizar eficazmente a superfície do dente e subsequentemente iniciar a cárie dentária.

Além da cavidade oral, *S. mutans* pode colonizar outras regiões do corpo, como vagina e trato gastrointestinal, causando diversas patologias. Seu papel como uma das principais causas de bacteremia em pacientes com neutropenia é um problema crescente⁴, e seu envolvimento em choque séptico, síndrome da angústia respiratória do adulto, e endocardite é bem conhecido (26% em valva nativa e 16% em prótese valvar).⁵ Beta-lactâmicos são as drogas de escolha para *S. mutans*, no entanto, cepas resistentes à penicilina estão sendo cada vez mais isoladas na Europa e nos Estados Unidos e tornaram-se um assunto de preocupação.⁶

A crescente resistência microbiana ocorre como uma resposta ao uso excessivo de antibióticos e também pela adaptação natural que esses microorganismos adquirem no meio ambiente.⁷ Assim, as infecções causadas por bactérias multirresistentes, representam um grave problema de saúde pública, cujo impacto é mundial, o que torna a busca de novos agentes antimicrobianos extremamente importante.⁸

Um enfoque para a descoberta de novos fármacos são os compostos sintéticos, preparados diretamente por pesquisadores, sendo que estes têm o domínio da química relacionada à preparação das substâncias iniciais bem como de análogos daquelas que se mostrarem ativas. Isso traz agilidade para o processo de otimização da estrutura química (estudos de relação estrutura química versus atividade biológica).⁹

Assim, o presente estudo teve como objetivo testar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos sintéticos, denominados DT12, PEG e 19, contra *S. mutans*, obtendo perspectivas da descoberta de novas formas de tratamento de modo a diminuir as taxas de letalidade/mortalidade.

MATERIAL E MÉTODO

Foram realizados testes com três compostos sintéticos glicídicos

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) – Laboratório de Microbiologia - CPF 35.501-296 – Divinópolis – MG

² Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal – CEP 31270-901 - Belo Horizonte, MG, Brasil. – Email: camilacassani_1@yahoo.com.br

e aromáticos, cedidos pelo Prof. Ricardo José Alves, originários de uma quimioteca do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Faculdade de Farmácia/UFMG. Esses compostos foram testados através do método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à *S mutans* ATCC 25175. Além disso, foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) de cada composto.

Os testes foram realizados em dois momentos, um imediatamente após diluição dos compostos e outro após 24h de armazenamento em refrigerador a -20°C para avaliar a estabilidade dos compostos.

Primeiramente, foi preparado o inóculo da bactéria *S. mutans*, sendo reativada em Caldo Nutriente por 24h. Posteriormente, foi semeada em estria composta em placa de Petri contendo Ágar Nutriente e incubada por 24h a 37°C, para isolamento de colônias. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas dos compostos em DMSO 20% em concentrações que variaram de 8000 µmol/L a 62,5 µmol/L. Foram retiradas entre 2 a 3 colônias isoladas, transferindo-as para um solução salina 0,85%. A turbidez da solução bacteriana obtida foi ajustada com uma solução padrão de MacFarland 0,5, o que representa aproximadamente 10⁸ UFC/ml. Posteriormente, foram retirados 50 µL da solução salina (equivalente a escala de Mc Farland de 0,5) e 10 mL de caldo Mueller-Hinton foram adicionados, o que equivale a uma concentração de 5 x 10⁵ UFC/ mL. Em placas de 96 poços foram utilizados controles positivos (estreptomicina 75 µg/ml, inóculo e caldo MH), controles negativos (DMSO 20%, inóculo e caldo MH), controles de crescimento (inóculo e caldo MH); controle de esterilidade do caldo (MH); branco da amostra (composto e caldo MH) e amostra (composto, inóculo e caldo MH). Dessa forma, as concentrações finais dos compostos nos poços variaram de 800 µmol/L a 6,25 µmol/L. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e a CIM foi avaliada com base na menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento microbiano (detectada pela falta de turbidez, através de leitura da placa em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm).

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), alíquotas de 25µL de cada concentração do composto inoculado que obtiveram CIM foram retiradas após a incubação e semeadas em placas contendo ágar MH. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e a CBM foi avaliada como a concentração do composto mínima que resultou em um crescimento de até 0,1% do inóculo inicial. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes para cada concentração do composto.

A CIM de cada composto frente à *S. mutans* foi determinada estatisticamente através de análise de variância dos valores de absorbância obtidos por espectrofotômetro, apresentados em triplicatas, e posterior teste de Tukey (p<0,05) para analisar a diferença entre as médias dos valores obtidos entre o branco da amostra, amostra, controle positivo e controle negativo, através do programa GraphPrisma 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto 19 mostrou efeito bacteriostático com CIM de 100 µmol/mL frente a cepa de *S. mutans* (Figura 1 e tabela 1). Por outro lado, a bactéria não apresentou sensibilidade aos compostos DT12 e PEG nas concentrações testadas (CIM > 800 µmol/mL). A estreptomicina, usada como controle positivo, apresentou CIM entre 3,9 e 62,5 mg / mL. Nenhuma atividade foi observada para o controle negativo (DMSO 20%), como esperado.

Tabela 1. CIM e CBM dos compostos DT12, PEG e 19

Compostos	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	
	CIM(µmol/L)	CBM(µmol/L)
DT12	*	*
PEG	*	*
19	50 a 100	*

* : sem atividade antimicrobiana

Em vista da importância clínica do composto que apresentou atividade antimicrobiana frente à *S. mutans*, os presentes resultados encorajam estudos adicionais, a fim de isolar e caracterizar compostos e propriedades antimicrobianas destas estruturas químicas sintéticas.

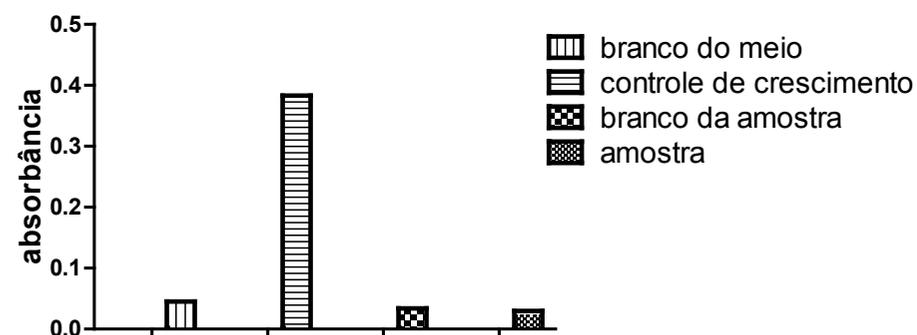


Figura 1. Efeito do composto 19 na [100 $\mu\text{mol/mL}$] frente à *S. mutans*. A amostra contém: composto, inóculo e caldo MH; o branco da amostra: composto e caldo MH, controle de crescimento: inóculo e caldo MH; e branco do meio: caldo MH. Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de variância dos valores de absorbância e posterior teste de Tukey, sendo que não houve diferença significativa entre as médias da amostra e branco da amostra ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A CIM obtida para o composto 19 foi de 100 $\mu\text{mol/mL}$ contra bactéria a bactéria *S. mutans*. No entanto, nenhuma atividade foi observada pelos compostos DT12, PEG. Os resultados mostraram que os compostos sintéticos glicídicos e aromáticos têm um potencial efeito antimicrobiano, tornando-se uma opção importante para a prospecção de novas moléculas com propriedades antibióticas.

REFERÊNCIAS

- 1 LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay **Microbiol Rev**, v. 50, p. pp. 353 a380, 1986.
- 2 SCHILLING, K. M.; BOWEN, W. H. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function s specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, v. 60, n. 1, p. 284-95, 1992. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).
- 3 KURAMITSU, H. K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 159-76, 1993. ISSN 1045-4411 (Print)1045-4411 (Linking).
- 4 PRESTERL, E. et al. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 1, p. 45-50, 2005. ISSN 0305-7453 (Print)0305-7453 (Linking).
- 5 MURDOCH, D. R. et al. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. **Arch Intern Med**, v. 169, n. 5, p. 463-73, 2009. ISSN 1538-3679 (Electronic)0003-9926 (Linking).
- 6 KNOLL, B. et al. Infective endocarditis due to penicillin-resistant viridans group streptococci. **Clin InfectDis**, v. 44, n. 12, p. 1585-92, 2007. ISSN 1537-6591 (Electronic)1058-4838 (Linking).
- 7 WINKWORTH, C. L. Antibiotic resistance genes in freshwater biofilms along a whole river. **J Water Health**, v. 11, n. 2, p. 186-198, 2013. ISSN 1477-8920 (Print)1477-8920 (Linking).
- 8 SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004. ISSN 0104-0707.
- 9 TOMLINSON, S. M.; MALMSTROM, R. D.; WATOWICH, S. J. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. **Infect Disord Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 327-43, 2009. ISSN 2212-3989 (Electronic)1871-5265 (Linking).