

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTI-HELICOBACTER DE PRODUTOS SINTÉTICOS BIOATIVOS

Bruna Ferrarezi Netto¹;

Samara Gema²;

Fernanda Velame De Oliveira³;

Luis Fernando Silva de Oliveira⁴;

Sergio de Mendonça⁵

Área do Conhecimento: Ciências da Vida.

Palavras-chaves: Helicobacter; síntese química; antimicrobiano

Helicobacter pylori é uma bactéria que está associada a doenças como gastrites, úlceras gástricas, úlceras duodenais e câncer gástrico (MARSHALL e WARREN, 1983; GO, 2002). Estudos epidemiológicos estimam que metade da população mundial esteja infectada, com uma prevalência maior em países em desenvolvimento (GOODMAN & COCKBURN, 2001). Os tratamentos terapêuticos utilizados para a erradicação da infecção combinam três medicamentos, sendo dois antimicrobianos (CARVALHAES et al., 1997). Estudos de eficiência terapêutica realizados no Brasil mostraram um índice de sucesso em torno de 70% da intenção de tratar (MENDONÇA et al., 2000; ECCLISSATO et al., 2002). A falência terapêutica está associada com vários fatores, que incluem a escolha de drogas inadequadas, a não aderência do paciente até o final do tratamento devido aos efeitos colaterais provocado pelos medicamentos e, principalmente, o aumento da aquisição de resistência aos antimicrobianos (ECCLISSATO et al., 2002). Em decorrência do aumento de resistência de *H. pylori*, diversos estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de novos medicamentos que possam atuar como opção terapêutica para o tratamento. Compostos obtidos de plantas, como chalconas, alcalóides, alcalóides indólicos e aminas estão entre os compostos mais promissores.

OBJETIVOS

Avaliar a atividade anti-*Helicobacter in vitro* de compostos de origem natural, alterados por síntese química, do grupo dos alcalóides, aminas e chalconas, como: Chalconóides, Benzalftalidas, Benzalftalazinonas, Aminocicloalcalones e Imidazosindoles.

METODOLOGIA

Compostos semi-sintéticos:

Os 36 compostos naturais, alterados por síntese

química foram obtidos pelo colaborador Prof. Dr. Arturo San Feliciano, da Universidade de Salamanca, Espanha.

Linhagem de *Helicobacter pylori*:

Para avaliação da atividade anti-*Helicobacter*, os compostos foram analisados quanto à interferência ao crescimento da linhagem de referência 26695 (ATCC 700392).

Cultivo de *Helicobacter pylori*:

As bactérias foram preservadas em uma solução de caldo Brucella com 20 % de glicerol, ficando mantidas a uma temperatura de -196 °C em tambor de nitrogênio líquido, sendo reativadas por semeadura em placas de Petri contendo agar Columbia seletivo pela adição de 5 % hemácias de carneiro, 10 mg/L de vancomicina, 20 mg/L de ácido nalidíxico e 10 mg/L de anfotericina B. As placas foram incubadas a 37 °C em condições de microaerofilia, (5-6 % de O₂, 8-10 % de CO₂, 80-85% de N₂) com 95 % de umidade relativa por um período de 48 h.

Caracterização Microbiológica

Durante todos os procedimentos experimentais as bactérias foram observada ao microscópio óptico após a coloração de Gram, para o controle quanto a manutenção da viabilidade e características típicas desta bactéria.

Difusão de substâncias em discos de papel

Placas de Petri com meio de cultura de Mueller-Hinton (MH) adicionado de 5% de hemácias de carneiro foram semeadas com 50µl da suspensão bacteriana da linhagem 26695, ajustada para a densidade de

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: bruna_ferrarezi@hotmail.com¹

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: gemasamara@gmail.com²

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: fvelame@gmail.com³

Estudante do Curso de Mestrado em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo; e-mail: lfs_1982@hotmail.com⁴

Professor da Universidade Bandeirante de São Paulo; e-mail: smendonca@uniban.br⁵

aproximadamente 6×10^8 ufc/ml, pela comparação com o tubo 2 da escala de MacFarland. Após 15 minutos, discos de papel de filtro estéreis de 6mm de diâmetro, semelhantes aos discos de antibióticos comercializados porém sem princípio ativo, foram impregnados com 10 μ l de uma solução do composto a ser analisado, sendo transferidos com uma pinça estéril para a superfície da placa de Petri semeada. As placas foram incubadas a 37°C, nas condições de microaerofilia durante 72 h. Os testes foram realizados em duplicata e o resultado expresso como a média dos valores obtidos.

Método da Microdiluição

As bactérias reativadas por cultura em meio sólido após dois dias de cultivo tiveram a densidade ajustada para 6×10^8 ufc/ml. Diluições seriadas dos compostos estudados, variando de 1,0mg/ml até 0,001mg/ml, foram preparadas em caldo brucella contendo 0,25% de extrato de levedura e 10% de soro fetal. Após o inóculo das bactérias, as microplacas foram incubadas a 37°C em condições microaerofilicas com 95% de umidade relativa por 3 dias. 2 μ l da suspensão bacteriana foram transferidos das microplacas, através de replicador manual, para placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, adicionado de 5% de hemácias de carneiro e 0,001% de anfotericina B, sendo incubadas por 3 dias em condições microaerofilicas. A concentração bactericida mínima foi a menor concentração do composto capaz de matar 99% das bactérias contidas na inoculação bacteriana original.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de concentração bactericida mínima (CBM) obtidos para a bactéria *Helicobacter pylori* 26695. Dos 36 extratos etanólicos avaliados positivamente quanto a atividade anti-helicobacter, 9 apresentaram melhores resultados, com valores entre 1 μ g/ml e 100 μ g/ml. Os melhores resultados em cada grupo foram: chalconóides JD-105M e JD-146M; benzaftalidas B-1030, B-6080 e B-21110; aminocicloalcalonas AC-00/00 e AC-00/29; benzalftalazinona F-069 e imidazosoindol I-1070.

CONCLUSÕES

A avaliação e quantificação da atividade bactericida para *Helicobacter pylori* de compostos semi-sintéticos permitiram a seleção de 9 compostos com atividade entre 1 μ g/ml e 100 μ g/ml. Estes valores são promissores para material desta natureza. A continuidade dos estudos prevê a avaliação da atividade in vivo, em modelo murínico.

Chalconóides	CBM
JD-48M	120 ug/ml
JD-39M	140 ug/ml
JD-58M	120 ug/ml
JD-65M	125 ug/ml
JD-68M	150 ug/ml
JD-69M	160 ug/ml
JD-80M	260 ug/ml
JD-87M	350 ug/ml
JD-90M	270 ug/ml
JD-98M	270 ug/ml
JD-105M	75 ug/ml
JD-146M	100 ug/ml
JD-121M	260 ug/ml
JD-133M	400 ug/ml
JD-153M	270 ug/ml

Benzaftalidas	CBM
B-1030	3 ug/ml
B-6080	25 ug/ml
B-2100	220 ug/ml
B-21110	100 ug/ml

Aminocicloalcalonas	CBM
AC-00/00	100 ug/ml
AC-00/29	300 ug/ml
AO-00/29	100 ug/ml
AA-00/29	200 ug/ml
OA-00/04	500 ug/ml
OA-10/28	200 ug/ml
OA-10/11b	220 ug/ml
AO-13/00	200 ug/ml
AA-40/29	370 ug/ml

Benzalftalazinonas	CBM
F-069	2 ug/ml
F-1031	540 ug/ml
F-4061	200 ug/ml
F-21070	500 ug/ml

Imidazosoindoles	CBM
I-1060	100 ug/ml
I-1070	35 ug/ml
I-1110	500 ug/ml
I-21030	100 ug/ml

Tabela 1. Concentração bactericida mínima (CMB) de compostos semi-sintéticos para *Helicobacter* 26695.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHAES, A.; MAGALHÃES, A. F. N.; CORDEIRO, F. Terapêutica e epidemiologia da infecção por “*H. pylori*”: recomendações do primeiro seminário promovido pelo “Núcleo Brasileiro para o Estudo do “*Helicobacter pylori*”. **GED**, **16**: 99-100,1997.

ECCLISSATO, C.; MARCHIORETTO, M. A. M.; MENDONÇA, S.; GODOY, A. P. O.; GUERSONI, R. A.; DEGUER, M.; PIOVESAN, H.; FERRAZ, J. G. P.; PEDRAZZOLI, J. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter**, **7(1)**: 53-59, 2002.

GO M. F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, **16**:3-15, 2002.

GOODMAN, K. J.; COCKBURN, M. The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. **Epidemiology**,**12**:266-71,2001

MENDONÇA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M. S.; GODOY, A. P. O.; GUERZONI R. A.; DEGGER, M.; PEDRAZZOLI, J. J. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**,**5**:79-83, 2000.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B.. Unified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**; **i**: 1273-1275, 1983.