

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA 8-HIDROXIQUINOLINA EM BACTÉRIAS DE INTERESSE ODONTOLÓGICO – ESTUDO *IN VITRO*

Thais de Cássia Negrini¹, Lucas Bozzetti Pigozzi², Rafael Morawski², Maurício Moreira³, Lina Naomi Hashizume⁴, Rodrigo Alex Arthur^{4*}.

1. Pós-doutoranda na Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Conservadora, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. FO-UFRS.

2. Graduandos em Odontologia. FO-UFRS.

3. Doutorando do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica. FO-UFRS.

4. Docentes. FO-UFRS. *Correspondência: Rodrigo Alex Arthur, Rua Ramiro Barcelos, 2492, Bairro Bom Fim, Porto Alegre-RS, CEP: 90035-003. E-mail: rodrigoarthur.ufrs@gmail.com

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da 8-hidroxiquinolina (HQ) contra alguns patógenos envolvidos na cárie dentária e estomatite, como o *Streptococcus mutans* (SM), *Lacobacillus casei* (LC) e *Candida albicans* (CA). Alíquotas de suspensões padronizadas de cada microrganismo foram uniformemente colocadas em placas de ágar de sangue (SM e CA) e Rogosa (LC). Discos de papel filtro estéril com diâmetro padronizado foram impregnados com solução alcoólica de HQ em diferentes concentrações (de 40 mg/mL a 0,019 mg/mL) e transferidos para placas de ágar. A clorexidina 0,12% (CHX), etanol e água esterilizada foram utilizados como controles. As placas foram incubadas à 37°C por 24h (CA) ou 48h em condições microaerófilas (SM e LC). O diâmetro dos halos de inibição foi medido com um paquímetro digital e calculou-se a razão entre este diâmetro sobre o diâmetro do papel filtro. Os resultados foram analisados estatisticamente e observou-se que, para SM, o efeito antimicrobiano de HQ em concentrações de 40 a 5 mg/mL foi estatisticamente superior à CHX. Este efeito foi mais baixo em concentrações inferiores a 0,31 mg/mL. Para LC, a HQ em concentrações de 40 a 1,25 mg / mL mostrou efeito semelhante à CHX. Para CA, apenas a HQ na concentração de 40 mg/mL apresentou melhor efeito em comparação com a CHX. Pode-se concluir que a HQ tem efeito antimicrobiano contra os agentes patogênicos da cavidade oral, principalmente contra a SM e CA, sendo um composto antimicrobiano promissor na odontologia. **Palavras-chave:** 8-hidroxiquinolina. Atividade antimicrobiana. Cárie dentária.

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF 8-HYDROXYQUINOLINE AGAINST ORAL CAVITY PATHOGENS - *IN VITRO* STUDY

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of 8-hydroxyquinoline (HQ) against some pathogens involved in dental caries and stomatitis, such as *Streptococcus mutans* (SM), *Lacobacillus casei* (LC) and *Candida albicans* (CA). Aliquots of standardized suspensions of each microorganism were evenly plated onto blood agar plates (SM and CA) and rogosa agar (LC). Sterile filter paper discs with standardized diameter were impregnated with alcoholic solution of HQ in different concentration (from 40 mg/mL to 0,019 mg/mL) and transferred to agar plates. Chlorhexidine 0.12% (CHX), ethanol and sterile water were used as controls. Plates were incubated at 37°C for 24h (CA) or 48h under microaerophilic conditions (SM and LC). The diameter of inhibition halos were measured with a digital caliper and it was calculated a ratio between that measurement of the halos and the diameter of the filter papers. Results were statistically analyzed. It was observed that for SM, the antimicrobial effect of HQ in concentrations from 40 to 5 mg/mL was statistically higher than CHX, but this effect was lower in concentrations lower than 0.31 mg/mL. For LC, HQ in concentrations from 40 to 1.25 mg/mL showed antimicrobial effect similar to CHX. For CA, only HQ in concentration of 40 mg/mL showed better antimicrobial effect compared to CHX. It can be concluded that HQ presents antimicrobial effect against oral cavity pathogens, mainly against SM and CA, being a promise antimicrobial compound for use in dentistry. **Keywords:** 8-hiroxyquinoline. Dental Caries. Microbiology.

INTRODUÇÃO

A 8-hidroxiquinolina (HQ) é uma quinolina derivada da planta *Sebastiania comiculata*, a qual é utilizada amplamente como reagente quelante de metais. No organismo humano, os íons metálicos desempenham um papel fundamental nos processos biológicos, visto que a perda da homeostase, inclusive quando causada por sobrecarga ou deficiência de metal, pode acarretar diversas doenças (1). Além dessa propriedade, também há estudos que demonstram a atividade antimicrobiana exercida por essa substância (2,1,3,4).

O efeito antimicrobiano da HQ tem sido consideravelmente descrito na literatura (5,6). Uma avaliação do efeito antimicrobiano da HQ e de seus derivados frente às bactérias da flora intestinal, tais como *Bifidobacterium longum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* demonstrou que a HQ apresentou efeito contra esses microrganismos pelo teste de difusão em ágar, no qual foi observada forte inibição para *E. coli* e *C. difficile* na concentração de 0,5mg/disco, e para *C. perfringens* na concentração de 0,1mg/disco (2). Ainda em relação ao efeito antimicrobiano da HQ, resultados demonstraram que uma solução aquosa obtida a partir desse composto numa concentração de 0,5 % inibiu o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes a uma concentração de 12,5 µg/mL. O estudo demonstrou que essa solução aquosa cliva a parede celular desses microrganismos acarretando em lise celular e que é capaz de eliminar 99,9% de todas as células bacterianas avaliadas num período de 6 horas, dado semelhante ao observado para o antibiótico gentamicina (7). Assim, tem sido sugerida a utilização tópica desse composto (o qual não causa resistência bacteriana comparada ao uso rotineiro de antibióticos) para limpeza das mãos na tentativa de se evitar a transmissão deste patógeno (7).

Na cavidade bucal, existem centenas de espécies de microrganismos que, em associação, formam o biofilme, resultando em um ecossistema amplamente rico e diverso para o desenvolvimento de bactérias e fungos. Dentre esses microrganismos, estão os principais agentes etiológicos desencadeantes da cárie e de estomatites (8). A cárie dentária é a doença bucal mais comum em todo o mundo afetando, já na dentição decídua, cerca de 32% dos indivíduos pré-escolares e na permanente 28,5% (9). Trata-se de uma doença infecciosa crônica causada por ácidos provenientes da fermentação, por bactérias do biofilme dental, dos carboidratos da dieta que, com o tempo, causam a desmineralização dos tecidos duros dos dentes (10). Entre os principais microrganismos envolvidos nesta doença encontram-se os *Streptococcus*

mutans e *Lactobacillus* sp., uma vez que são capazes de tolerar ambientes de baixo pH decorrentes da fermentação dos carboidratos da dieta, o que confere uma vantagem ecológica em relação a outras bactérias do biofilme dental (11,12).

Atualmente, há evidências crescentes de que *C. albicans* participa ativamente em biofilmes cariogênicos por meio da interação sinérgica com o *S. mutans* (13,14). Sugere-se que a maior produção de matriz extracelular, facilitada pela área da superfície vinculada à rede de hifas, suporta o crescimento do biofilme misto na superfície dentária.

Em relação às estomatites, a candidíase é a infecção fúngica oral mais prevalente, sendo presente em aproximadamente 20% dos usuários de prótese a partir dos 50 anos. A *Candida albicans*, é responsável pela colonização das próteses e o principal microrganismo envolvido na candidíase oral (12,15,16,17). Inadequada higiene oral, imunossupressão, radioterapia de cabeça e pescoço e uso de próteses totais mal higienizadas estão dentre os principais fatores predisponentes para o desenvolvimento dessa doença. Com o aumento da idade, há uma piora na motricidade tendo-se assim um decréscimo na qualidade da higiene oral dos idosos ocasionando uma maior ocorrência de doenças oportunistas, como a candidíase (18).

Em vista do exposto, sabe-se que o controle mecânico é a melhor forma de prevenir e controlar o biofilme dental, mas nem todos os indivíduos conseguem realizá-lo de maneira adequada. Além disso, seria desejável que um agente antimicrobiano pudesse ser usado na desinfecção de próteses totais. Dessa maneira, a utilização de substâncias antimicrobianas pode ser apontada como recurso adjunto ao controle mecânico do biofilme e tem sido motivo de diversos estudos devido a sua facilidade de aplicação e abrangência nos sítios da cavidade bucal (19).

Dentre as soluções comerciais presentes no mercado, como coadjuvante para o controle químico do biofilme dental utilizado atualmente, a clorexidina é considerada o padrão ouro (20). Esse antisséptico apresenta ação antimicrobiana frente a uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sendo, também, eficaz contra alguns fungos e vírus. Não há relatos na literatura de resistência antimicrobiana em longo prazo para esse antimicrobiano (20,21). Entretanto, diversos estudos demonstram efeitos colaterais locais como manchas acastanhadas nos dentes, restaurações e dorso de língua, além de alteração do paladar, erosão da mucosa oral (em concentrações mais elevadas), tumefação da parótida (ocorrência rara) e estímulo da formação de cálculo supragengival em decorrência da precipitação das proteínas salivares na superfície dentária o que proporciona um aumento na

espessura da película adquirida e/ou a precipitação de sais na camada da película (21,22). Em relação à desinfecção de próteses, o composto utilizado em soluções de imersão é o hipoclorito de sódio a 0,5% considerado padrão ouro (23). Entretanto, essa solução, além de causar deteriorização da prótese, pode ocasionar danos aos tecidos da cavidade bucal. Desta forma, tem-se buscado métodos alternativos de desinfecção que sejam menos nocivos a prótese e aos tecidos bucais (24,25).

Devido aos efeitos adversos ocasionados pelos agentes antimicrobianos considerados padrão ouro, há necessidade da busca de métodos alternativos de controle químico que sejam mais eficazes e seguros, sem efeitos deletérios relevantes para o paciente. Com a carência de compostos ideais, o presente estudo buscou avaliar o efeito antimicrobiano da HQ sobre alguns patógenos da cavidade bucal envolvidos com cárie dental ou candidíase, como os microrganismos *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus casei* (LC) e *Candida albicans* (CA), a fim de investigar novos compostos a serem utilizados na área odontológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo dos microrganismos

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente às seguintes cepas padrão: *Streptococcus mutans* (UA 159) (SM), *Lactobacillus casei* (ATCC 4646) (LC) e *Candida albicans* (ATCC 90028) (CA). As cepas foram reativadas a partir de estoques congelados em *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Becton Dickinson and Company*, Sparks, MD) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrilado (para SM e CA) ou ágar Rogosa (HIMEDIA) (para LC) e as placas foram incubadas à 37°C por 48 horas. Unidades formadoras de colônias (UFC) foram transferidas das placas de ágar para tubos contendo BHI suplementado com 1% de sacarose para o crescimento de SM e LC e BHI suplementado com 1% de glicose para o crescimento de CA. Os tubos foram incubados à 37°C por 24 horas. Decorrido esse período, os mesmos foram centrifugados a 3042 rpm, por 10 minutos. Foi, então, realizado o descarte do sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 5 mL de solução salina para a obtenção do inóculo [turbidez 0.5 da escala de MacFarland (PROBAC do Brasil, nefelobac Lote:NEFE050510) – aproximadamente 1×10^8 UFC/mL].

Preparo das soluções de 8-hidroxiquinolina

Uma solução de 40 mg/mL de 8-hidroxiquinolina (Sigma-Aldrich lote. #BCBN2733V) em etanol absoluto foi preparada sob constante agitação. Esta solução

foi seriadamente diluída em etanol absoluto para obtenção de soluções com concentrações de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,078 mg/mL, 0,039 mg/mL e 0,019 mg/mL. Essas soluções foram acondicionadas em microtubos esterilizados e imediatamente utilizadas no ensaio descrito abaixo.

Ensaio de disco-difusão em ágar

Após ajuste da densidade óptica das suspensões microbianas, cerca de 100 μ L de cada suspensão microbiana foi semeada em placas de Petri contendo ágar sangue para SM e CA e ágar Rogosa para LC. Papéis filtro estéreis (8 mm de diâmetro cada) foram impregnados com solução de quinosol nas concentrações descritas acima e transferidos para as placas de ágar, sendo 3 discos de papel filtro utilizados para cada concentração analisada. Como controles foram utilizados Periogard® 0,12% (Colgate® lote. 09 2014AK), etanol (Casa da Química, álcool etílico 95% PA-ACS93INPM CAQ, lote 09030445, cod. 311619) e água destilada esterilizada. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para SM e LC e 24 horas para CA. Os halos de inibição foram medidos em milímetros com auxílio de um paquímetro digital (Digimess, Shinko Precision Ganging LTD.). As medidas foram determinadas a partir de dois pontos opostos localizados nos limites mais externos do halo de inibição formado ao redor de cada disco, incluindo-se a medida do disco. Então, foi calculada uma razão entre o diâmetro do halo de inibição e o diâmetro do papel-filtro.

Análise estatística

Os resultados da razão entre o halo de inibição e o diâmetro dos discos de papel filtro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste de Holm-Sidak para comparação entre diferentes tratamentos dentro do mesmo microrganismo e para comparação do mesmo tratamento entre microrganismos diferentes. O nível de significância foi de 5% e a análise foi realizada no software SigmaPlot 12.0. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão para cada condição avaliada.

RESULTADOS

Em relação ao SM, o efeito antimicrobiano da HQ nas concentrações de 40 a 5 mg/mL foi estatisticamente maior que o da CHX. Entretanto, em concentrações inferiores à 0,31 mg/mL, a HQ apresentou efeito antimicrobiano inferior ao da CHX.

Para LC, HQ nas concentrações de 40 a 1,25 mg/mL apresentou efeito antimicrobiano semelhante à CHX, sendo que em concentrações menores que 1,25 mg/mL, a HQ apresentou menor efeito quando comparada à CHX. Para CA, a HQ apresentou melhor efeito em relação à CHX apenas na concentração de 40 mg/mL, não havendo diferença em relação às demais concentrações (Figura 1). Nenhum efeito antimicrobiano foi observado após exposição aos discos de filtro contendo água destilada ou etanol (dados não mostrados).

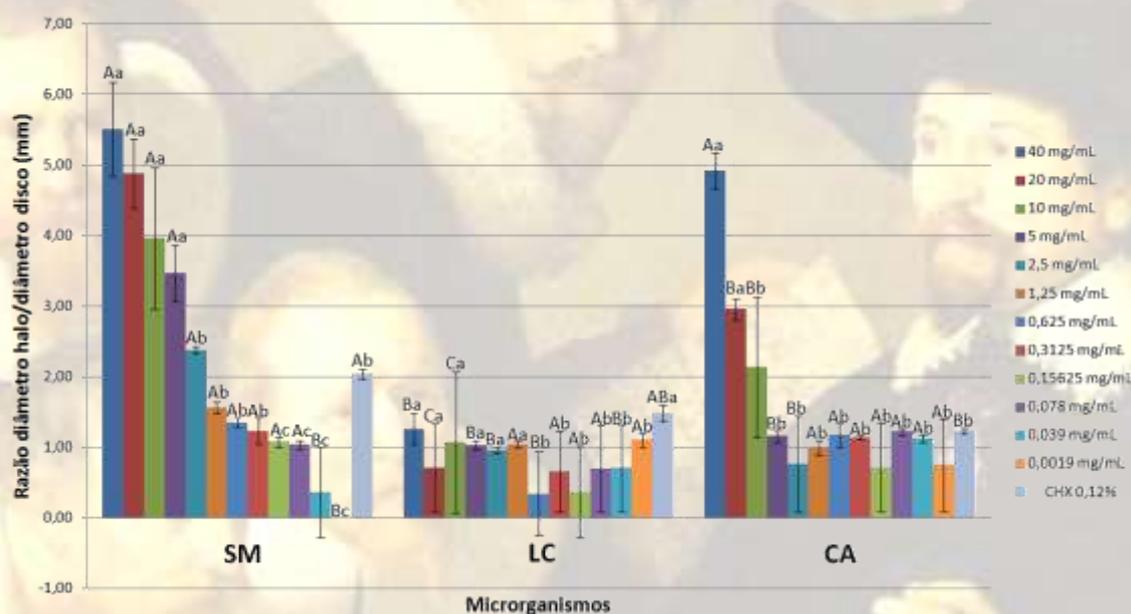


Figura 1. Razão entre o halo de inibição e o diâmetro do papel filtro (média ± dp) em relação os diferentes tratamentos e microrganismos.

Linhas verticais representam o desvio-padrão.

Barras verticais seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si na comparação entre os microrganismos para cada concentração analisada enquanto que barras verticais seguidas por letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre si na comparação com o grupo CHX dentro de cada microrganismos pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o SM apresenta uma maior sensibilidade ao composto HQ quando comparado ao LC e CA, apresentando uma maior tendência de inibição quanto maior for a concentração da HQ (até 40mg/mL) (Figura 1). Em 2012, foi demonstrado que a HQ (1mg/mL) apresentou atividade semelhante a da CHX(0,12%) frente ao SM (6). Sabe-se que pacientes com atividade de cárie dentária apresentam uma maior contagem microbiológica de *S. mutans*. Sendo assim, o uso da HQ contra o SM poderia resultar em um benefício ao paciente que não consegue controlar biofilme dental satisfatoriamente. Em contrapartida, o LC mostrou um comportamento variável, não seguindo uma proporcionalidade na

relação concentração x efeito antimicrobiano. Não há relatos na literatura que demonstrem a razão pela qual SM é mais sensível à HQ quando comparado ao LC, necessitando ser melhor investigada futuramente. A atividade antimicrobiana da HQ frente CA faz com que essa substância possa ser utilizada por pacientes usuários de prótese a fim de possibilitar a desinfecção das mesmas. O enxaguatório Malvatricin®, o qual é composto por tirotricina a 0,3 mg/mL e HQ a 10 mg/mL, apresentou ação bacteriostática, principalmente frente a bactérias Gram-positivas (26,27). Entretanto, observou-se que o único composto da formulação desse enxaguatório que apresenta efeito antimicrobiano é a HQ (6). Os resultados do presente estudo sugerem que a HQ, em concentrações maiores ou iguais a 5 mg/mL, exercem um efeito antimicrobiano em relação ao SM superior ao da CHX (Figura 1). Os resultados obtidos no presente estudo representam um primeiro *screening* do efeito antimicrobiano da HQ, a qual apresenta potencial para estudo e uso clínico no futuro. São necessárias novas investigações para verificar o mecanismo de ação, a citotoxicidade e a cinética do efeito antimicrobiano da HQ com o intuito de estabelecer melhores parâmetros para serem utilizados em estudos *in vivo*.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a HQ apresenta efeito antimicrobiano contra microrganismos da cavidade oral, especialmente para SM e CA, apresentando por isso potencial para ser utilizada na área odontológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crichton RR, Dexter DT, Ward RJ. Metal based neurodegenerative diseases-from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Coord Chem Rev.* 2008; 252(10–11):1189–1199.
2. Jeon JH, Lee CH, Lee HS. Antimicrobial activities of 2-methyl-8-hydroxyquinoline and its derivatives against human intestinal bacteria. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2009; 52(2):202–205.
3. Vanparia SF, Patel TS, Sojitra NA, Jagani CL, Dixit BC, Patel PS, et al. Synthesis, Characterization and antimicrobial study of novel 4-[(8-Hydroxyquinolin-5-yl) methylamino]benzenesulfonamide and its oxinates. *Acta Chim Slov.* 2010; 57(3):600–667.
4. Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 4(7):1157-78.
5. Torres CRG, Cubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. *Rev Fac Odontol São José dos Campos.* 2000; 3:43-52.
6. Moreira MJS, Ferreira MBC, Hashizume LN. In vitro Antimicrobial Activity of the Components of a Mouthwash Containing *Malva sylvestris*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* João Pessoa. 2012 Out/Dez; 12(4):505-09.
7. Short BR, Vargas MA, Thomas JC, O'Hanlon S, Enright MC. In vitro activity of a novel compound, the metal ion chelating agent AQ+, against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan; 57(1):104-9.

8. O'Donnel LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, et al. Polymicrobial Candida biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Research*. 2015 Nov; 15(7).
9. Avellar-Silva AB, De Oliveira LMA, Silveira RG, Miasato JM, Neves AA, Prevalência de Cárie Dentária em Pré-escolares de uma Escola Particular em uma Região Rural do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Pesqui. Saúde*. 2012; 14(1):49-56.
10. Fejerskov O, Kidd E. Cárie Dentária: a doença e seu tratamento. 2ª ed., [reimp.], São Paulo; Santos, 2013.
11. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994; 73:672–81.
12. Becker RM, Paster JB, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JM, et al., Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J. Clin. Microbiol*. 2002 March; 40(3):1001-1009.
13. Belda-Ferre P, Acaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J*. 2012 Jan; 6(1):46-56.
14. Simón-Soro, A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics Reveals Overall Active Bacterial Composition in Caries Lesions. *J Oral Microbiol*. 2014; 6:10.3402/jom.v6.25443.
15. Mesas AE, Andrade FM, Cabrera MAS. Condições de saúde bucal de idosos de comunidade urbana de Londrina, Paraná. *Rev. bras. epidemiol*. 2006. 9(4):471-480.
16. Paraguassú GM, Pimentel, PA, Santos AR, Gurgel CAS, Sarmiento VA. Prevalência de lesões bucais associadas ao uso de próteses dentárias removíveis em um serviço de estomatologia. *Rev Cubana Estomatol*. 2011 Sep; 48(3):268-276.
17. Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *J. Appl. Oral Sci*. 2012; 20(1):70-75.
18. Padilha DM, Hugo FN, Hilgert JB, Dal Moro RG. - Hand function and oral hygiene in older institutionalized Brazilians. *J Am Geriatr Soc*. 2007 Sep; 55(9):1333-8.
19. Gebran MP, Gebert APO. Controle químico e mecânico da placa bacteriana. *Tuiuti: Ciência e Cultura*. 2002; 26(3):45-58.
20. Lindhe J, Lang NP, Karring T et al. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. 5ª ed. [Reimpr.] Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
21. Wade W, Addy M, In vitro activity of a chlorhexidine containing mouth-rinse against subgingival bacteria. *J Periodontol*. 1989; 60:25-31.
22. Flotra L, Gjermo P, Rolla G, Waerhaug J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. *Scand J Dent Res*. 1971; 79:119-125.
23. Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2013; 110:356–62.
24. Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2015 Oct 12. doi:10.1111/odi. 12380. [Epub ahead of print].
25. Neville B, et al. Patologia oral & maxilofacial. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
26. Da Silva NB, Alexandria AKF, De Lima AL, Claudino LV, Carneiro TFO, Costa AC et al. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. *Contemp Clin Dent*. 2012 Jul-Sep; 3(3):302-305.
27. Monfrin RC, Ribeiro MC. In vitro evaluation of the effects of antiseptic mouthrinses on the microflora from saliva. *Rev Assoc Paul Cirur Dent*. 2000;54:400–7.

Recebido: novembro / 2015

Aceito: dezembro / 2015.