

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE UM DERIVADO ARILAMINOMETILÊNICO DO ÁCIDO DE MELDRUM FRENTE A CEPAS MULTIRRESISTENTES

Maria Milene Costa da Silva¹, José Bezerra de Araújo Neto², Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino³, Talysson Felismino Moura⁴, Ricardo Gomes dos Santos Nunes⁵, Iêda Maria Begnini⁶, Ricardo Andrade Rebelo⁷, Maria Isabel Lacowicz Krautler⁸, Saulo Relison Tintino⁹

Resumo: Hodiernamente, um dos grandes problemas da saúde pública é o aumento das doenças causadas por bactérias multirresistentes. Logo, este estudo objetivou avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos de um derivado arilaminometilênico do ácido de Meldrum em cepas multirresistentes. Para a Concentração Inibitória Mínima, realizou-se a microdiluição em caldo, com o composto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo- [1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il}-acetamida com cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Para a atividade modificadora, teve-se o composto em concentração sub-inibitória (CIM/8), associado às fluoroquinolonas. O composto direto não teve atividade antibacteriana relevante. Entretanto, combinado às fluoroquinolonas, apresentou sinergismo, reduzindo a concentração dos antibióticos. Os resultados são justificados, principalmente, pela estrutura química do composto que intensifica a ação dos antibióticos associados. Conclui-se que este composto derivado do arilaminometilênico do ácido de Meldrum, pode ser um forte aliado dos antibacterianos.

Palavras-chave: Resistência. Fluoroquinolonas. Ácido de Meldrum.

1. Introdução

Hodiernamente, percebe-se que uma das principais problemáticas que atuam sobre a saúde pública em uma escala mundial, é a resistência bacteriana. Nesse sentido, observa-se ainda que no transcorrer dos anos a busca por medidas capazes de controlar esse processo apresentou-se de forma contínua (OLIVEIRA, 2008).

Nesse contexto, convém destacar ainda que o mecanismo de resistência adquirido pelas bactérias a ação dos antibióticos, está proporcionalmente relacionada com o uso indiscriminado e indevido deste mesmo. Essa questão torna-se cada vez mais motivo de preocupação na sociedade moderna, não apenas pelo seu elevado perfil de adquirir resistência como resposta à ação de

1 Universidade Regional do Cariri, email: mariamilenecs@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri,

3 Universidade Federal do Pernambuco,

4 Universidade Regional do Cariri,

5 Universidade Regional do Cariri,

6 Fundação Universidade Regional de Blumenau- FURB

7 Fundação Universidade Regional de Blumenau- FURB

8 Fundação Universidade Regional de Blumenau- FURB

9 Universidade Regional do Cariri, email: saulorelison@gmail.com

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



drogas, mas também por ter como característica um processo irreversível (SANTOS, 2004).

Os mecanismos de atuação dos antibióticos estão em concordância com as características de sobrevivência das bactérias, seja esta Gram positiva ou Gram negativa. Independente da sua natureza, um aspecto que imutável é que a bactéria necessita que sua parede celular esteja conservada, para que suas funções se mantenham constante e inabaláveis, pois esta estrutura é determinante e imprescindível para sua integridade e sobrevivência. (GOODMAN; GILMAN, 2008).

Frente aos aspectos já mencionados, é perceptível que a utilização de antibióticos como estratégia de controle para as bactérias multirresistentes, já não é suficiente para a minimização de tal problemática. Assim, faz-se cada vez mais presente estudos voltados para o mecanismo de ação sobre o crescimento bacteriano, que realizam uma combinação entre os antibióticos já descritos, agindo em conjunto com compostos químicos (SILVEIRA et al.,2006). Como exemplo de um composto que apresenta um significativo potencial para a realização de tal combinação, tem-se os heterocíclicos nitrogenados, que já apresentam grande aplicabilidade na química medicinal (NASATO, 2017), e dentro desse composto tem-se o arilaminometilênico do ácido de Meldrum, e seus derivados, que também apresentam grande potencial para aplicação clínica .

2. Objetivo

Avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos de um derivado arilaminometilênico do ácido de Meldrum em cepas multirresistentes.

3. Metodologia

A priori, foi realizada a diluição dos antibióticos e do derivado arilaminometilênico do ácido de Meldrum, em 1ml de DMSO (dimetilsulfóxido) e em água estéril para homogeneizar a mistura. Foram usadas cepas multirresistentes, sendo estas: *Escherichia coli* (EC 06), *Staphylococcus aureus* (SA 10) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA 24). As bactérias foram semeadas em meio de cultura sólido Heart Infusion Agar em placa de Petri e mantidas na estufa bacteriológica a uma temperatura de 37° C por um período de 24 h.

Para a preparação dos inóculos, tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,9% NaCl) foram preparados, em seguida adicionou-se a amostra bacteriana já crescida nessa solução, os tubos foram levados ao agitador vortex e tiveram sua turbidez comparada com à escala de McFarland 0.5 que corresponde a 10⁵ UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

Para a realização da Concentração Inibitória Mínima, foram preparados tubos Eppendorf contendo 900 µl do meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion)

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



a 10% e 100 µl do inóculo. O conteúdo foi distribuído em placas de microdiluição de 96 poços, sendo adicionados 100 µl em cada poço. Em seguida, foi feita a microdiluição seriada utilizando-se 100 µl dos compostos, até o penúltimo poço, sendo este o controle de crescimento bacteriano, de modo que a concentração variou de 512 a 8 µg/ml. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C e mantidas por 24h (OLIVEIRA et al, 2017). Para a leitura do resultado da CIM, 20 µl de resazurina foram adicionados em cada poço, após um período de 1h, foi possível observar a mudança de cor, onde a cor rosa indicou que houve o crescimento bacteriano e a permanência da cor azul indicou a ausência de crescimento bacteriano.

Para a realização da ação modificadora do composto, em tubos Eppendorf foram adicionados 1162 µl de BHI 10%, 150 µl do inóculo de cada bactéria e uma quantidade do composto atendendo à concentração sub-inibitória (CIM/8 = 128 µg/ml). Para os controles de modulação do teste, foram preparados Eppendorfs com 1350 µl do meio BHI 10% e 150 µl do inóculo. O conteúdo dos tubos foi distribuído em placas de microdiluição de 96 poços, 100 µl em cada poço, em sentido numérico. A microdiluição seriada foi realizada com 100 µl de cada antibiótico, até o penúltimo poço. Os testes foram realizados em triplicata e as placas levadas para estufa bacteriológica por 24h a uma temperatura de 37 °C, após esse período foi realizado a leitura do teste com a resazurina, observando a mudança de cor.

Para a análise dos resultados obtidos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, os dados foram analisados através de um teste ANOVA de duas vias, sendo utilizado como dados centrais a média geométrica das triplicatas e o desvio padrão da média. Posteriormente, teve-se a realização do teste post hoc de Bonferroni, sendo considerado significativo um valor de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ e $p > 0,05$ foi considerado insignificante.

4. Resultados

A atividade antibacteriana direta do composto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il}-acetamida, contra as bactérias de *Escherichia coli* (EC 06), *Pseudomonas aeruginosa* (PA 24) e *Staphylococcus aureus* (SA 10), não apresentaram resultado satisfatório para o âmbito clínico. Pois, através do teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto sobre as bactérias multirresistentes, o resultado da concentração foi equivalente a um valor de 1024 µg/ml, sendo este um resultado não muito relevante.

Os resultados conseguidos nos testes de modulação com o composto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il}-acetamida associado a ação das fluoroquinolonas (lomefloxacina, ofloxacina e norfloxacina), apresentaram ação sinérgica em todas as combinações, diminuindo a concentração inibitória mínima dos antibióticos sobre as bactérias multirresistentes. Em *Escherichia coli* (EC 06) a CIM com lomefloxacina, ofloxacina e norfloxacina, foi de 16 µg/ml; 16 µg/ml e 32 µg/ml, depois da associação reduziram para 8 µg/ml; 4 µg/ml e 8 µg/ml respectivamente. Com

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



Staphylococcus aureus (SA 10), obteve-se como resultado da concentração inibitória mínima do lomefloxacin a um valor de 64 µg/ml, com ofloxacin a concentração foi de 16 µg/ml e a norfloxacin apresentou um resultado de 128 µg/ml. Com a associação dos fluoroquinolados com o composto os resultados da CIM passaram a ser de 16 µg/ml, 8 µg/ml e 64 µg/ml, respectivamente. Nos ensaios com a *Pseudomonas aeruginosa* (PA 24), a concentração inibitória mínima dos antibióticos: lomefloxacin, ofloxacin e norfloxacin foram respectivamente, 16 µg/ml, 16 µg/ml e 128 µg/ml. Já quando a ação desses antibióticos foi combinada com a ação do produto testado, os resultados da CIM reduziram para 8 µg/ml, 4 µg/ml e 64 µg/ml (FIGURA 01).

Os resultados sinérgicos, observados nos ensaios da atividade modificadora dos antibióticos, quando associados à ação do composto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il} acetamida, está diretamente relacionada com a estrutura química do composto, bem como como o mecanismo de ação dos antibióticos, onde a combinação desses fatores permite que ocorra uma intensificação na atividade de atuação dos antibióticos sobre as bactérias multirresistentes.

O mecanismo de ação desses antibióticos, inibem da atividade do DNA, bem como a ação de algumas enzimas provocando a morte celular. Esses antibacterianos, atuam sobre a DNA girase, que é o principal objeto de atuação nas bactérias Gram negativas, como é o caso da *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e afetam também a enzima Topoisomerase IV que é a principal via de ação desses bactericidas em organismos Gram positivas, como é o caso da *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA; PEREIRA, 2010).

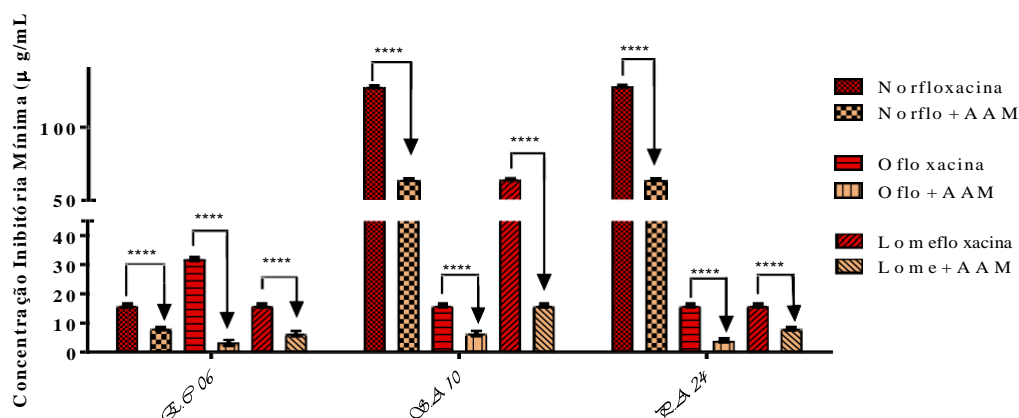


Figura 01. Atividade modificadora de antibióticos de N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo [1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il}-acetamida com norfloxacin, ofloxacin e lomefloxacin contra *E. coli* 06, *S. aureus* 10 e *P. aeruginosa* 24.

5. Conclusão

No presente estudo, foi possível observar a partir do objetivo do trabalho e dos resultados dos testes, que a ação do produto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo-

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



[1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il)-acetamida isoladamente não apresentou resultados relevantes para a aplicação no âmbito clínico, pois devido a sua alta concentração de ação, os riscos de toxicidade apresentam-se bastante elevados.

No entanto, quando este composto é associado a ação dos antibióticos fluoroquinolonas: lomefloxacin, ofloxacin e norfloxacin, os resultados apresentados são satisfatórios. Onde, contra a *Escherichia coli* (EC 06) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA 24), que são bactérias Gram negativas e até mesmo contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (SA 10), que é uma Gram positiva, a associação entre o produto e os antibióticos apresentaram efeito sinérgico. Ou seja, em todas as situações, a partir da combinação da ação antibiótica com o composto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il)-acetamida, os resultados mostrados correspondem a uma diminuição considerável na concentração inibitória mínima, capaz de atuar e interferir sobre o crescimento bacteriano. Assim, pode-se dizer que o composto N-{6-[(2,2-Dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxano-5-ilidenometil)-amino]-piridin-2-il)-acetamida potencializa a ação dos antibióticos pertencentes à classe dos fluoroquinolados, tendo a associação destes compostos atuando como uma alternativa promissora contra o crescimento bacteriano das cepas Gram negativas *Escherichia coli* (EC 06) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA 24) e da Gram positiva *Staphylococcus aureus* (SA).

6. Referências

GOODMAN & GILMAN's. (2008). **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. Nova Iorque: McGraw Hill.

NASATO, M. C. **1,8-naftiridinas sulfonamídicas: obtenção, caracterização e avaliação antiprotozoária e antifúngica**. 2017. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

OLIVEIRA, F. S.; et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of a-bisabolol, b-cyclodextrin and a-bisabolol/b-cyclodextrin complex. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 1111-1118, 2017.

OLIVEIRA, R.; PEREIRA, T. A. **Farmacêuticas Clínicas – Serviços Farmacêuticos** José de Mello Saúde, 2010.

OLIVEIRA, A. C; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem** [Internet]. 2008;10(1):189-197.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, vol. 13, núm. Esp, 2004, pp. 64-70 Universidade Federal de Santa Catarina Santa Catarina, Brasil.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006.