

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA POR DERIVADOS DO ÁCIDO DE MELDRUM EM *Pseudomonas aeruginosa*

Gildênia Alves de Araújo¹, Ewerton Yago de Sousa Rodrigues², Daniel Sampaio Alves³, Isaac Moura Araújo⁴, Ana Carolina Ferreira Araújo⁵, Janaína Esmeraldo Rocha⁶, Henrique Douglas Melo Coutinho⁷, Saulo Relison Tintino⁸

Resumo: Diante da problematização do uso indiscriminado de antibióticos a OMS declarou a resistência bacteriana como um problema global. a cepa *Pseudomonas aeruginosa* que apresentam perfil de resistência por que é um dos principais agentes causadores de infecção. Um mecanismo de resistência são as enzimas β -lactamases da qual causa modificações e inativam o antibiótico. Assim, o uso de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa, promissora na atividade antibacteriana e na reversão da resistência bacteriana. O ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) é um composto químico amplamente utilizado na síntese de heterociclos, dentre os quais os derivados arilamino metileno se destacam por apresentarem significativo potencial biológico. O objetivo do estudo é verificar a atividade dos derivados do ácido meldrum frente cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos. O método utilizado foi a técnica de microdiluição em caldo para avaliação a ação direta dos derivados como também associadas aos antibióticos. Diante do estudo pode-se concluir que ambos os derivados possuem atividades potencializadoras como também são compostos capazes de inibir a enzima da β -lactamases.

Palavras-chave: Produtos naturais. Bactérias. Resistência.

1. Introdução

O uso indiscriminado de antibióticos gerou uma problematização, segundo a Organização Mundial de saúde (OMS) em outubro de 2017, declarou que a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos principais problemas de saúde global, uma vez que prolonga a hospitalização, aumenta os custos do

¹ Universidade Regional do Cariri, email: gildenia.araujo@urca.br

² Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.sousarodrigues@urca.br

³ Universidade Regional do Cariri, email: daniel.sampaio10@urca.br

⁴ Universidade Regional do Cariri, email: isaac.moura@urca.br

⁵ Universidade Regional do Cariri, email: caroljustino@outlook.com

⁶ Universidade Regional do Cariri, email: janainaesmeraldo@gmail.com

⁷ Universidade Regional do Cariri, email: hdmcoutinho@urca.br

⁸ Universidade Regional do Cariri, email: saulo.tintino@urca.

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

tratamento e, ainda mais criticamente, aumenta significativamente a mortalidade relacionada com doenças infecciosas (Harbarth., *et al* 2015).

Entre as classes de bactérias que apresentam perfil de resistência está a cepa *Pseudomonas aeruginosa* da qual é um dos principais agentes de infecção nosocomial em hospitais brasileiros, onde diversos estudos têm associado sua presença a uma disseminação clonal da espécie (Freitas.,*et al* 2002).

Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos é a produção de β -lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo, assim que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (Bush, 1988; Livermore, 1995; Rossolini, 2005).

Assim, o uso de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa, promissora na atividade antibacteriana e na reversão da resistência bacteriana (Araújo *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2020). O ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) é um composto químico amplamente utilizado na síntese de heterociclos, dentre os quais os derivados arilamino metileno se destacam por apresentarem significativo potencial biológico (Sampaio *et al.*, 2014).

A síntese de substâncias puras isoladas tornou-se uma ferramenta de grande importância para o desenvolvimento de fármacos com propriedades farmacológicas aprimoradas, e atualmente o uso da modelagem molecular contribui marcadamente para a descoberta de novos fármacos, mais seguros e eficientes. Os derivados de ácido de Meldrum já foram utilizados como materiais de partida para a síntese de compostos orgânicos complexos, incluindo vários produtos sintéticos e naturais (Dey *et al.*, 2015; Ivanov., *et al* 2008; Mcbac, 1978; Sampaio *et al.*, 2014) As sínteses de compostos heterocíclicos aromáticos também têm proporcionado a obtenção de novos compostos ativos com uma grande variedade de atividade biológica.

2. Objetivo

Verificar a atividade dos derivados do ácido meldrum frente cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos.

3. Metodologia

3.1 Cepa Bacteriana:

Foi utilizada a cepas de *P. aeruginosa* com a linhagem 24, da qual possui resistência a diversas classes de antibióticos. A cepa foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular-LMBM, da Universidade Regional do Cariri-URCA.

3.2 Substâncias:

Os três derivados de ácido meldrum classificados como "MAD 1, MAD 2 e MAD 3" foram fornecidos Sigma Aldrich Brasil. Os antibióticos utilizados foram Norfloxacino, Gentamicina, Ampicilina e Ampicilina + subactam para avaliar a questão enzimática ambos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em água destilada estéril. Todas as substâncias foram diluídas até uma concentração padrão de 1024 μ g/mL.

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM):

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) serão utilizadas placas de microdiluição de fundo chato (96 poços). Cada poço desta, será preenchido com 100 μL de solução Brain Heart Infusion + inóculo (1×10^8 UFC/mL). Posteriormente, será realizada a microdiluição seriada (1:1 v/v) com os derivados, obtendo-se diferentes concentrações (0,5 – 512 $\mu\text{g/mL}$). Tais placas serão acondicionadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Após esse período, será realizada a leitura por meio do método colorimétrico utilizando a resazurina (CLSI, 2018).

3.4 Atividade Potencializadora associada com os antibióticos:

Após determinar a CIM, será realizado o teste de potencialização de antibióticos (gentamicina, Ampicilina e Ampicilina + Sulbactam para avaliação enzimática). Com base nos resultados da CIM, os derivados de ácido meldrum serão avaliados em concentrações subinibitórias (CIM/8) (Coutinho *et al.*, 2008). Será preparada uma solução em microtubos de BHI com o inóculo (10%) e os derivados (CIM/8), que seram distribuídos nos poços da placa. Em seguida, será feita uma microdiluição seriada (1:1 v/v) utilizando os antibióticos mencionados. As placas serão incubadas por 24 horas a 37 °C e submetidas ao teste colorimétrico.

3.5 Estatísticas

Os resultados foram expressos em média geométrica \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (two-way ANOVA) seguido pelo pos-test Bonferroni utilizando o software *GraphPad Prism*. 9.2.0, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

Foram obtidos os seguintes resultados, na associação direta com os compostos de ácido meldrum "MAD 1, MAD 2 e MAD 3" frente cepa bacteriana de *P. aeruginosa* obtiveram resultados ≤ 1024 mg/mL. Associado ao antibiótico norfloxacino ambos os derivados mostraram os seguintes resultados, sendo que MAD 1 permaneceu uma concentração inicial de 2 mg/ml mantendo-se igual ao controle o resultado em MAD 2 observa-se uma redução de 2 mg/ml para uma redução 1,75 mg/ml. Com relação ao MAD 3 o mesmo mostrou um antagonismo já que saiu da concentração inicial o controle de 2mg/ml para 5mg/ml como mostrado na figura 1.

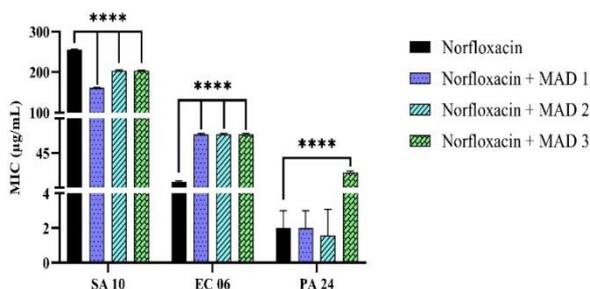


Figura 1 : "****" $p < 0.0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de dois fatores e teste posthoc de Bonferroni.

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Associado ao antibiótico Ampicilina e Ampicilina + Subactam para avaliar a possível inibição enzimática ambos os derivados apresentaram o seguinte resultado na avaliação com Ampicilina mais sulbactam houve uma redução 700mg/ml para 15mg/ml havendo a possível inibição do mecanismo enzimático. Na associação do antibiótico ampicilina os derivados MAD 1 E MAD 2 apresentaram um antagonismo saindo de uma concentração inicial de 700mg/ml para 1000mg/ml. Contudo é possível observar que o derivado "MAD 3" teve uma maior significância já que saiu de uma concentração inicial de 700 mg/ml para 500 mg/ml.

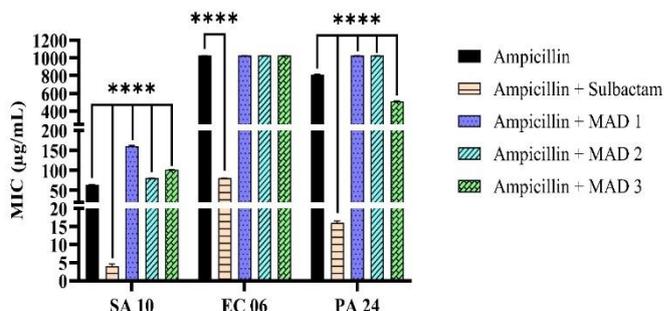


Figura 2: "****" $p < 0.0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de dois fatores e teste posthoc de Bonferroni..

Contudo associado ao antibiótico Gentamicina frente a cepa de *P. aeruginosa* não houve resultados significantes associados aos derivados estudados como mostrado na figura 3.

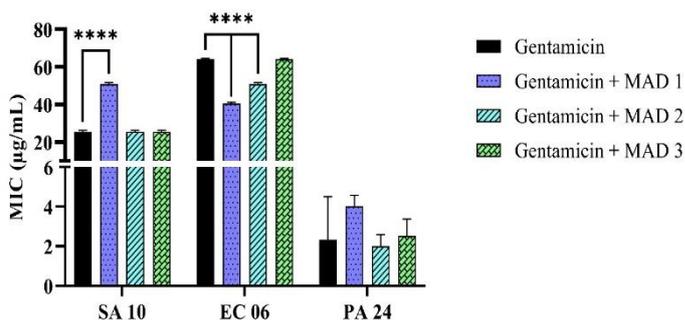


Figura 3: "****" $p < 0.0001$ indicates significant differences between the groups. The statistical significance was determined by ANOVA of two factors and Bonferroni posttest.

5. Conclusão

Diante dos estudos apresentados os derivados de ácido meldrum potencializou o efeito dos antibióticos e possivelmente inibindo a enzima da β -lactamases. Contudo frente ao antibiótico gentamicina ambos os derivados não mostraram resultados significantes, carecendo de mais estudos para respaldar os dados.

6. Agradecimentos

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Universidade Regional do Cariri-URCA, ao Fundo Estadual de Combate à Pobreza (FECOP) pelo financiamento da pesquisa e ao laboratório de microbiologia molecular-LMBM.

7.Referências

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, v. 146, n. 3713, p. 837, 1940.

ARAÚJO, A. C. J. *et al.* GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains. *Food and Chemical Toxicology*, v. 136, p. 111023, 2020.

BUSH, K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 1, n. 1, p. 109-123, 1988.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

DANTAS, G.; SOMMER, M. O. A. Context matters—the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 15, n. 5, p. 577-582, 2012.

DE FREITAS, A. L.; BARTH, A. L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2002.

DEY, T. *et al.* 5-Arylidene derivatives of Meldrum's acid: Synthesis, structural characterization using single crystal and powder crystal X-ray diffraction, and electronic properties. *Journal of Molecular Structure*, v. 1092, p. 51-62, 2015.

FREITAS, P. R. *et al.* GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. *Industrial Crops and Products*, v. 145, p. 112106, 2020.

HARBARTH, S. *et al.* W. H.-A. I. R. F. participants. *World Health Organization*, 2015.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.

KENNEDY, M. *A brief history of disease, science and medicine: from the ice age to the genome project*. Califórnia: Asklepiad Press, 2004.

LIVERMORE, D. M. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

ROSSOLINI, G. M. Acquired metallo- β -lactamases: an increasing clinical threat. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, p. 1557-1558, 2005.