

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 *Staphylococcus aureus*.

Ewerton Yago de Sousa Rodrigues¹, Gildênia Alves de Araújo², Ana Carolina Ferreira Araújo³, Maria Yasmin Cândido de Oliveira⁴, Isaac Moura Araújo⁵, Janaína Esmeraldo Rocha⁶, Daniel Sampaio Alves⁷, Simone Galdino de Sousa⁸, Saulo Relison Tintino⁹

Resumo:

Staphylococcus aureus é uma das principais causas de infecções hospitalares e comunitárias, associada à significativa morbidade, resultado da adaptação bacteriana à exposição excessiva aos antibióticos. O ácido de Meldrum é um composto químico amplamente utilizado na síntese de heterociclos, destacando-se os derivados arilamino metileno por seu potencial biológico. Este trabalho avalia o efeito inibitório de derivados do ácido de Meldrum na resistência bacteriana de *Staphylococcus aureus*. A metodologia de microdiluição em caldo foi utilizada para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos, que em seguida foram testados em combinação com antibióticos para avaliar sua capacidade de reduzir a CIM dos fármacos. Dentre os antibióticos, apenas a norfloxacin apresentou potencialização, com o composto mais eficaz reduzindo a CIM em 100 µg/mL. Sugere-se, então, que os derivados do ácido de Meldrum podem atuar como aliados no combate à resistência bacteriana de *S. aureus* quando combinados com norfloxacin, embora novos estudos sejam necessários para investigar outras cepas e mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo.

Palavras-chave: Ácido de Meldrum. Resistência bacteriana. *Staphylococcus aureus*

Introdução: *Staphylococcus aureus* está entre as principais causas de infecções em pacientes com infecção hospitalar e comunitária e está associado à morbidade significativa. Como hospedeiro natural humano, é encontrada nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos. A partir desses locais, esta bactéria pode alcançar as outras regiões da pele e das mucosas.

-
- ¹ Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.sousarodrigues@urca.br
 - ² Universidade Regional do Cariri, email: gildenia.araujo@urca.br
 - ³ Universidade Regional do Cariri, email: caroljustino@outlook.com
 - ⁴ Universidade Regional do Cariri, email: yasmin.oliveira@urca.br
 - ⁵ Universidade Regional do Cariri, email: isaac.moura@urca.br
 - ⁶ Universidade Regional do Cariri, email: janainaesmeraldo@gmail.com
 - ⁷ Universidade Regional do Cariri, email: daniel.sampaio10@urca.br
 - ⁸ Universidade Regional do Cariri, email: simone.galdino@urca.br
 - ⁹ Universidade Regional do Cariri, email: saulorelison@gmail.com

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"

Entretanto, em caso de comprometimento das barreiras naturais por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local, caracterizando o processo infeccioso (ROBERTS; CHAMBERS, 2005).

As infecções microbianas tornaram-se um dos principais problemas de saúde pública no mundo, afetando todos os países, em desenvolvimento ou desenvolvidos. Pode estar relacionado ao processo de seleção natural no desenvolvimento bacteriano ou à consequência natural da adaptação das bactérias à exposição aos antibióticos no decorrer do uso indiscriminado em humanos e animais (GIBBONS, 2004). Neste sentido, o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de reverter essa resistência bacteriana é necessário para a continuidade do tratamento clínico das infecções. Assim, produtos sintéticos exibindo atividade antibiótica direta ou atividade em conjunto com antibióticos podem ser muito úteis.

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.

Objetivo: Portanto, pretende-se com o presente trabalho avaliar o potencial inibitório da resistência bacteriana de derivados do ácido de meldrum em *Staphylococcus aureus*.

Metodologia: Os compostos derivados do ácido de Meldrum serão sintetizados e fornecidos pelo Professor Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná - UFPR. Os três derivados do ácido de Meldrum receberão os acrônimos MAD1, MAD2 e MAD3, sendo MAD (Derivados do ácido de Meldrum). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) e os antibióticos norfloxacin, ampicilina e gentamicina foram obtidos da Sigma Aldrich. A cepa bacteriana usada será a *S. aureus* 10.

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) será realizada em microplacas estéreis com 96 poços e serão diluídas seriadamente 1:1. A cultura em ágar mantida em estoque será repicada e repassada uma placa de petri com meio de cultura HIA Ágar e incubadas a 37° C por 24 horas. Após esse período, será adicionado em *ependorfs*, 100µL de meio caldo BHI em 900µL de inóculo bacteriano e, este, será transferido para a placa em sentido numérico. Após esse processo, será realizado a microdiluição das substâncias, com concentração de 1024µg/dL, até a penúltima cavidade. As placas preenchidas serão incubadas a 37 ± 2°C por 24 horas (CLSI, 2018), todos os testes serão realizados em triplicata. Para evidenciar a CIM das amostras, será preparada

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



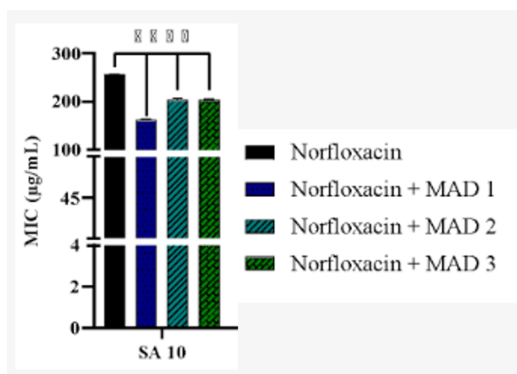
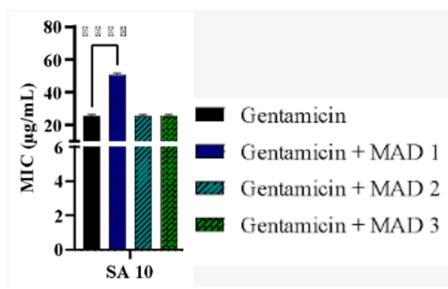
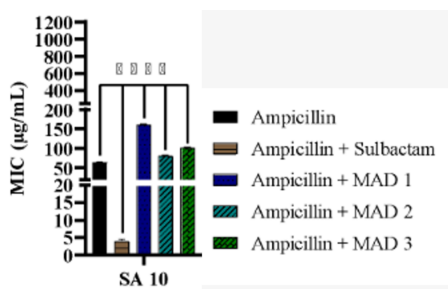
Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 μ L da solução indicadora serão adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Para avaliar o potencial da substância como modificadora da resistência aos antibióticos, será utilizado o método proposto pela (CLSI, 2018). A solução será testada em concentração subnibitória (CIM/8). O meio de distribuição será preparado em tubos *ependorf*® contendo cada *BHI* 10% + 150 μ L da suspensão bacteriana + substância, atingindo 1,5 mL de solução. Para controle, a solução de 1,5 mL possuirá apenas *BHI* 10% + 150 μ L de suspensão microbiana. A placa de microdiluição será preenchida no sentido alfabético, adicionando 100 μ L da solução de distribuição em cada cavidade, em seguida fazendo microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100 μ L do antibiótico até a penúltima cavidade, posteriormente as placas serão incubadas a 37° C por 24 horas. A leitura será realizada pela adição de 20 μ L de resazurina. A redução do CIM do antibiótico específico é um indicativo de que houve potencialização de seu efeito. Todos os experimentos serão realizados em triplicatas.

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 $p < 0,05$.

Resultados:



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"



“****” $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups. Statistical significance was determined by two-way ANOVA and Bonferroni posthoc test.

Os derivados do ácidos de Meldrum, assim como em Houghton et al. (2007), não apresentaram ação antibacteriana direta, com valores de CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Neste estudo, sua combinação com gentamicina e ampicilina não potencializou o efeito dos antibióticos, mantendo os valores de CIM inalterados em relação ao controle negativo (antibiótico sozinho), apesar de Sampaio et al. (2014) terem obtido resultados opostos com gentamicina contra outra cepa de *S. aureus*. Em alguns casos, como MAD 1 com gentamicina, o ácido pode ter prejudicado a ação do fármaco (CIM aumentou de 21 $\mu\text{g/mL}$ no controle para 45 $\mu\text{g/mL}$). Com ampicilina, os três derivados tiveram efeito semelhante, com MAD 1 elevando a CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$ para 150 $\mu\text{g/mL}$, em contraste com o controle positivo (ampicilina + sulbactam: 50 $\mu\text{g/mL}$ para 4 $\mu\text{g/mL}$). Já com norfloxacin, todos os ácidos potencializaram a inibição bacteriana, destacando-se MAD 1, que reduziu a CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ para 150 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo um efeito sinérgico e redução da resistência bacteriana, em concordância com Sampaio et al. (2014).

Conclusão: Assim, sugere-se que os derivados do ácido de Meldrum podem atuar como aliados no combate à resistência bacteriana de *Staphylococcus aureus* quando combinados com norfloxacin, embora novos estudos sejam necessários para explorar outras cepas e mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo.

Agradecimentos: À URCA, Universidade Regional do Cariri. Ao LMBM, laboratório de Microbiologia e Biologia molecular e à Funcap, órgão de fomento à pesquisa.

Referências:

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Eleventh Edition: M07. 2018.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, vol. 21, no. 2, p. 263–277, 2004.

Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol* 2007;110: 391-400.

ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, vol. 35, p. S97-105, 2005.

SAMPAIO, G. M. M.; TEIXEIRA, A. M. R.; COUTINHO, H. D. M.; JUNIOR, D. M. S.; FREIRE, P. T. C.; BENTO, R. R. F.; SILVA, L. E. Synthesis and

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"

antibacterial activity of a new derivative of the Meldrun acid: 2, 2-dimethyl-5-(4H-1, 2, 4-triazol-4-ylaminomethylene)-1, 3-dioxane-4, 6-dione (C₉H₁₀N₄O₄). **EXCLI journal**, vol. 13, p. 1022, 2014.