

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE NOVAS SULFADIAZINAS

Amanda de Carvalho Pereira Moraes¹, Yuri De Azevedo Amaral Silva²

¹ Professor – Centro Universitário de Itajubá – FEPI, amandinhafar@yahoo.com.br

² Estudante – Centro Universitário de Itajubá, yuriazvdo@outlook.com.

RESUMO

As sulfonamidas representam o grupo precursores de quimioterápicos utilizados no tratamento de infecções bacterianas, são antimicrobianos de amplo espectro, tendo efeito sobre bactérias gram positiva e negativa, podendo ser usada para tratamento humano e veterinário. As sulfonamidas não tem apresentado grande uso nos últimos anos, o que torna um fator relevante para que ocorra um estudo sobre seus efeitos, e ainda mais a avaliação de novas moléculas derivadas das sulfadiazinas, que poderão apresentar baixo índice de resistência bacteriana. Os testes serão realizados com 10 compostos derivados da sulfadiazina, que serão colocados em disco para um teste de difusão em placa, para que então ocorra uma avaliação de sua capacidade de inibir o crescimento de 5 bactérias diferentes. Os resultados obtidos serão comparados com a sulfonamida de uso comercial, que já apresenta atividade antimicrobiana comprovada.

Palavras-chave: sulfonamida, resistência bacteriana, antibiótico.

INTRODUÇÃO

As sulfonamidas representam o grupo precursor de quimioterápicos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. São antimicrobianos de amplo espectro, de uso humano (Sköld, 2000) e veterinário (Grave, Torren-Edo *et al.*, 2010). As sulfa já foram muito usadas contra infecções estreptocócicas, estafilocócicas, gonocócicas, meningocócicas e pneumocócicas (FOCKS, KLASMEIER *ET AL.*, 2010; SKÖLD, 2010).

Atualmente, quimioterápicos da classe das sulfonamidas são associados à trimetoprim e pirimetamina e têm ação contra *Nocardia* spp. e *Toxoplasma gondii*, respectivamente, inclusive em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Vicente e Pérez-Trallero, 2010).

Atuam como inibidores competitivos do ácido p-aminobenzóico (PABA) (Liang, Wang *et al.*, 2013), Figura 2.4d, pela similaridade entre suas estruturas. A diidropteroato sintetase (DIPS) é responsável por catalisar o PABA e ácido 7,8-di-hidro-6-hidroxi-metilpterina-pirofosfato para a biossíntese do folato. Os derivados do folato são extremamente importantes na formação dos ácidos nucleicos e, conseqüente, síntese do ADN. Quando essa via é interrompida pelas sulfonamidas, ocorre supressão na síntese proteica e inibição do crescimento

microbiano, caracterizando em um efeito bacteriostático (Vinnicombe e Derrick, 1999; Focks, Klasmeier *et al.*, 2010; Vicente e Pérez-Trallero, 2010).

No último século, as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de morte e isso se deve a descoberta dos antibióticos. Entretanto, atualmente, a resistência a agentes antimicrobianos tem sido cada vez mais preocupante, pois as cepas se tornam resistentes rapidamente (HUH E KWON, 2011).

Pode-se considerar que a resistência das bactérias ocorre em consequência ao amplo uso de antibióticos, que também está presente no meio ambiente. As bactérias trocam material genético entre si, mesmo entre espécies diferentes e por isso são consideradas facilmente adaptáveis a agentes químicos e outros fatores. Antigamente a resistência era predominante em ambientes hospitalares, entretanto, atualmente pode atingir indivíduos sem qualquer doença e ocorre por alguns fatores básicos, como modificação do alvo (antibiótico não reconhece), inativação do antibiótico, variação na permeabilidade e inativação de enzima (Guimarães, Momesso *et al.*, 2010).

Dentre a variedade de bactérias, essa pesquisa se propõe avaliar a atividade sobre bactérias que comumente provocam infecções, são elas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa e *Klebsiella pneumoniae*.

No início dos anos de 1940 já se falava em cepas de bactérias sulfonamidas-resistente levando em consideração as infecções mais susceptíveis, como queimaduras em vítimas de guerra. A resistência bacteriana pode ocorrer devido a mutação ou por transferência de plasmídios, e resulta em uma (1) menor afinidade com a diidropteroato sintetase, (2) diminuição da permeabilidade ou efluxo do fármaco, (3) via metabólica alternativa para síntese do folato ou (4) aumento na produção do folato ou de antagonista do fármaco (HARDMAN, LIMBIRD *et al.*, 2003).

Embora as sulfonamidas não sejam muito utilizadas atualmente, principalmente pela existência de antibióticos mais eficazes, com menos efeitos colaterais e pela resistência de microorganismos perante às sulfas, estudos recentes com esse grupo podem ser interessantes pelo seu baixo e ausência do uso por muitos anos, o que coloca em questão a reversibilidade da resistência; considerando a resistência nos antibióticos em geral (Sköld, 2000). Sendo assim importante avaliar os potencial antimicrobiano de novos compostos derivados de sulfonamidas, que poderão ter aplicações clínicas em tratamento a infecções bacterianas, que antes apresentavam resistência a antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

O teste de difusão em placas, também denominado de teste de difusão em ágar ou em disco, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona ou halo de inibição do crescimento do microrganismo com a atividade antimicrobiana das substâncias testadas.

A zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco (discos estéreis circulares e controle positivo de 6 mm de diâmetro), até a margem onde há crescimento de microrganismos.

Como controle positivo, neste caso será utilizada a sulfonamida, disponível comercialmente. O conteúdo de sulfonamida presente nos discos é de 300µg/mL, quantidade determinada pela Anvisa com base nos testes de sensibilidade antimicrobiana do Instituto de Padrão Clínico e Laboratorial (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*).

Os testes serão realizados utilizando de 10 compostos diferentes derivados da sulfonamida em inibir o crescimento de 5 diferentes bactérias, gram positiva e negativa. Primeiramente, os discos contendo as bactérias serão dispersos em tioglicolato e

após 24h serão cultivados em biolacina por 24h à 37°C e depois cada inoculação será ajustada para o padrão de turbidez 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) para garantir a reprodutibilidade e preparados em ágar Mueller-Hinton não suplementado. A precisão da densidade ajustada do inóculo será verificada por meio de um espectrofotômetro.

O inóculo microbiano será semeado, na superfície das placas de Agar Mueller Hinton, com auxílio de swabs estéreis. Cada amostra circular (6 mm diâmetro) será colocada nas placas com 30 mm de distância entre si usando uma pinça esterilizada e após este procedimento as placas serão incubadas a 37° C por 24 horas.

A avaliação da atividade antimicrobiana será realizada observando-se a formação de halos de inibição ao redor das amostras padronizadas de 6 mm, realizado de acordo com a “Padronização dos Testes de Sensibilidade à Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição”, (Ostrosky, Mizumoto *et al.*, 2008)Anvisa, 2003. Dessa maneira, os novos derivados da sulfonamida serão diluídos em 10µL de água destilada e serão homogeneizados com auxílio de vórtex (MS 3 digital, IKA®) por cinco minutos a 2000rpm. As soluções serão transferidas para discos brancos estéreis de 6mm. Cada disco será em eppendorf previamente exposto a luz UV por 20 minutos. O teste será realizado depois de 24 horas, técnica adaptada de Schuck, Fratini *et al.*, 2001; Ostrosky, Mizumoto *et al.*, 2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por se tratar de um projeto onde a parte prática não foi realizada, não estão disponíveis resultados, apenas resultados preliminares, sendo eles a comprovação de atividade antimicrobiana em algum dos compostos testados e comparação destes resultados com as sulfonamidas de uso comercial, utilização destes composto com comprovada atividade para um teste de concentração inibitória mínima.

CONCLUSÕES

A presença de atividade antimicrobiana significativa nestes novos derivados da sultadiazinas apresenta grande potencial, já que novos moléculas podem se tornar novos medicamento, e estes novos medicamentos podem ser usados para tratar infecções, que eram resistentes aos fármacos disponíveis, tratando assim o maior problema relacionado a antibiótico, que afeta tanto o Brasil como o mundo. Pretende-se que os resultados obtidos sejam publicados, em revista científica indexada de impacto na área, bem como apresentados em congressos científicos nacionais e internacionais.

REFERÊNCIAS

FOCKS, A., J. KLASMEIER, *et al.* Mechanistic link between uptake of sulfonamides and bacteriostatic effect: Model development and application to experimental data from two soil microorganisms. Environmental Toxicology and Chemistry, v.29, n.7, p.1445-1452. 2010.

GRAVE, K., J. TORREN-EDO, *et al.* Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.65, n.9, September 1, 2010, p.2037-2040. 2010.

Guimarães, D. O., L. D. S. Momesso, *et al.* Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para descobertas e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, v.33, p.667-679. 2010.

Hardman, J. G., L. E. Limbird, *et al.*, Eds. Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. , p.877-881, , 10^a ed. 2003.

Huh, A. J. e Y. J. Kwon. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. Journal of Controlled Release, v.156, n.2, p.128-145. 2011.

Liang, X., Z. Wang, *et al.* A proof-of-concept receptor-based assay for sulfonamides. 438: 110-116 p. 2013.

Sköld, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. Drug Resistance Updates, v.3, n.3, p.155-160. 2000.

_____. Sulfonamides and trimethoprim. Expert Review of Anti-infective Therapy, v.8, n.1, p.1-6. 2010.

Vicente, D. e E. Pérez-Trallero. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v.28, n.02, p.122-130. 2010.

Vinnicombe, H. G. e J. P. Derrick. Dihydropteroate Synthase from *Streptococcus pneumoniae*: Characterization of Substrate Binding Order and Sulfonamide Inhibition. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.258, n.3, p.752-757. 1999.