



ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE NOVAS SULFADIAZINAS.

Yuri de Azevedo Amaral Silva⁽¹⁾; Pedro Augusto de Andrade Novaes⁽²⁾; Prof. Dr. Eder do Couto Tavares⁽³⁾; Profa. Dra. Daniela Sachs⁽³⁾; Profa. Dra. Amanda de Carvalho Pereira Moraes⁽⁴⁾

¹Centro Universitário de Itajubá – FEPI, Farmácia, yuriazvdo@outlook.com ²Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI, Química, pedroaugusto@hotmail.com ³Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI

⁴ Centro Universitário de Itajubá – FEPI, autor amandinhafar@yahoo.com.br

RESUMO

As sulfonamidas representam o grupo precursor 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 sulfas foram descobertas em 1930 a partir de estudos com o protosil, que apresenta um metabólito ativo. Elas atuam na inibição seletiva da síntese do DNA em bactérias, sendo assim, apresentam ação bacteriostática, dependendo do sistema imune para eliminação das bactérias. As sulfonamidas não tem apresentado grande uso nos últimos anos, o que torna um fator relevante para que ocorra um estudo sobre seus efeitos, já que essas novas moléculas derivadas das sulfadiazinas, poderão apresentar baixo índice de resistência bacteriana, contribuindo para resolver um dos maiores problemas relacionados a antibióticos. Os testes foram realizados com compostos derivados da sulfadiazina, que foram colocados em disco para teste de difusão em placa, e avaliação de sua capacidade de inibir o crescimento de cepas bacterianas diferentes e posteriormente aos testes de difusão em disco. Todos os testes realizados tiveram os resultados comparados com as sulfonamidas de uso comercial, assim como um segundo antibiótico com atividade comparada com aquela cepa testada. As moléculas testadas não apresentaram atividade satisfatória em sua maioria, sendo que apenas uma com uma atividade não considerada como de resistencia bacteriana.

Palavras-chave: Sulfonamida. Antibiótico. Antibiograma. Escherichia Coli. Staphylococcus aureus.

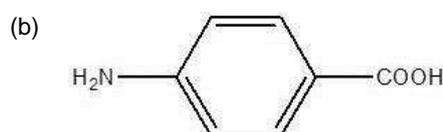
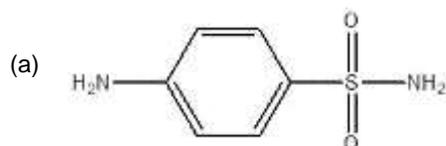
INTRODUÇÃO

As sulfonamidas (ou sulfas) 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). Sua estrutura (SO₂NH) é muito usada no desenvolvimento de novos medicamentos (Perlovich, Kazachenko *et al.*, 2014). Atualmente, quimioterápicos da classe das sulfonamidas são associados à trimetoprim e pirimetamina. As sulfonamidas atuam como inibidores competitivos do ácido p-aminobenzóico (PABA) (Liang, Wang *et al.*, 2013), Figura 1b, 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 DNA. 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). Os humanos não tem sua síntese de DNA afetada, pois não sintetizam o folato e sim o adquire por ingestão de alimentos que contém o ácido fólico (Sköld, 2000). A sulfonamidas tem sua efetividade maior na fase aguda das infecções, quando as bactérias se multiplicam rapidamente. Além disso, o efeito bacteriostático cessa em altas

concentrações de PABA ou concentração de sulfonamidas abaixo da dose inibitória (Fraser, 1996). Cabe ao sistema imunológico erradicar a infecção (Hardman, Limbird *et al.*, 2003).

Figura 1 – Estrutura Química



Estrutura química a) sulfanilamida e b) ácido para-aminobenzóico (PABA)

No último século, as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de morte e isso se deve a descoberta dos antibióticos. Porém, o grande desafio é elaborar um agente antimicrobiano capaz de agir por um longo prazo sem que a bactéria se torne facilmente resistente (Guimarães, Momesso *et al.*, 2010; Huh e Kwon, 2011). Sendo assim o presente trabalho objetiva avaliar a atividade antimicrobiana de novos derivados da sulfonamida.

MATERIAL E MÉTODOS

A técnica utilizada é 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.

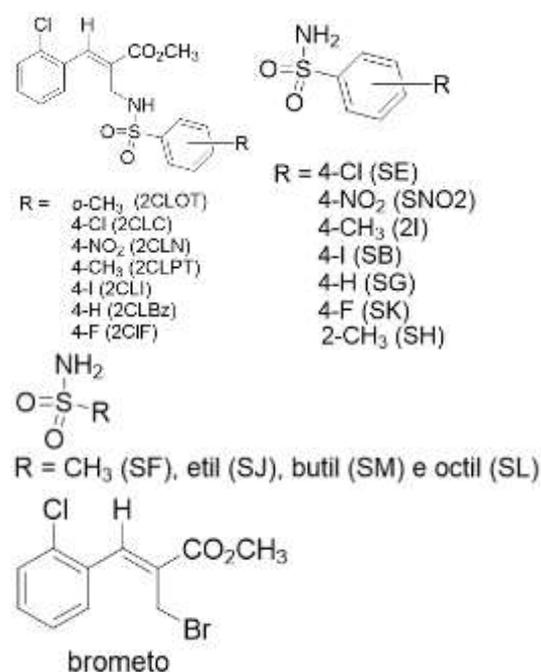
A zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco (discos estéreis circulares e controle positivo, de 6mm de diâmetro), até a margem onde há crescimento de microrganismos. Como controle positivo, neste caso foi utilizada a sulfonamida, disponível comercialmente.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

Posteriormente obtenção dos resultados do antibiograma para cepas de *E. Coli* e *S. aureus*, iniciou teste utilizando cepa de *Candida Albicans*. O método utilizado não teve alteração em relação ao utilizado para as bactérias. Esse teste teve como intuito comprovar uma possível atividade anti fungica das novas moléculas.

A estrutura molecular das novas sulfadiazinas testadas no presente trabalho pode ser observada a seguir na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura de novas moléculas



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra o tamanho médio do halo de inibição para cada molécula testada, indicando a ATCC avaliada. Todos testes foram realizados em triplicata e continham um disco em branco, contendo apenas o diluente usado no preparo dos discos. Foram realizados 18 antibiograma, sendo analisado 20 novas moléculas, disco padrão de sulfonamida, como controle positivo de atividade das sulfas, Imipenem para controle positivo de bactérias gram negativa e Vancomicina para gram positiva e discos contendo somente o diluente como controle negativo. Os halos obtidos foram medidos de uma borda de inibição a outra, desta forma, inclui o disco de 6mm.

Tabela 1 - Halo de inibição em milímetros (mm)

Moléculas	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 0022)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 0023)
Brometo	-	11mm
2CLOT	-	-
2CLC	-	-
2CLN	-	-
2CLPT	-	-
2CLI	-	-
2CLBZ	-	-
2CLF	-	-
SH	-	-
SI	-	-
SK	-	-
SC	9mm	-
SE	9mm	-
SNO2	10mm	19mm
SL	-	-
SJ	-	-
SF	-	-
SM	-	-
SB	-	-
SG	-	-
Branco	-	-
Sulfonamida	23mm	20mm
Imipenem	28mm	x
Vancomicina	x	18mm

Todos resultados foram comparados com valores padrões, disponibilizados pela CLSI, que pode ser verificado na tabela 2.

Tabela 2- Zona de inibição padrão em milímetros (mm)

Antibiótico	<i>Escherichia coli</i>		
	Resistente	Intermediária	Sensível
Sulfanamida	≤ 12	13-16	≥ 17
Imipenem	≤ 19	20-22	≥ 23

Antibiótico	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Resistente	Intermediária	Sensível
Sulfanamida	≤ 12	13-16	≥ 17
Vancomicina	≤ 14	15-16	≥ 17

Fonte: CLSI

Todos controles positivos obtiveram resultados dentro do esperado, com halos de inibição superiores ao determinado como sensível. Observando o resultado da sulfanamida, mostra uma pré-disposição a ação das novas sulfadiazinas. Entre as 20 moléculas testadas,

apenas 4 apresentaram algum tipo de atividade. SC, SE e SNO2 apresentaram atividade contra *Escherichia coli* (ATCC 0022), porem, com valores considerados de resistência, o Brometo apresentou resultado semelhante para a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023). A molécula SNO2 apresentou o melhor resultado, com um halo de inibição próximo ao do controle positivo, nos testes com a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023), comprovando que a bactéria era sensível a esta molécula, este resultado pode ser observado na figura 1. Nenhuma molécula apresentou atividade antifúngica considerável frente a *Candida Albicans*.

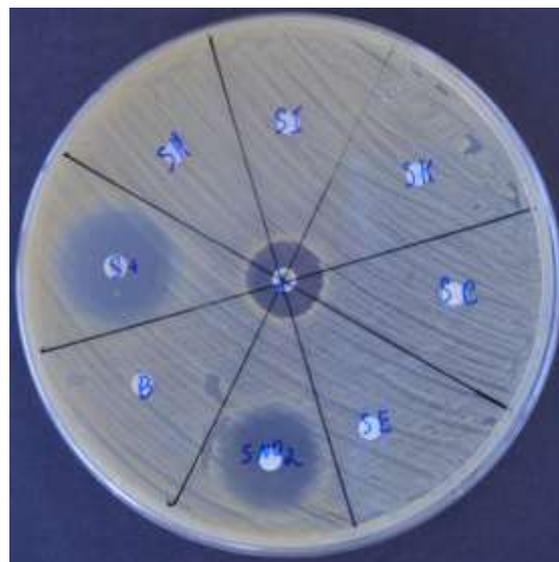


Figura 3 – Placa de teste com *S. aureus*

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos foi demonstrado o potencial antibacteriano da nova molécula, SNO2, com uma atividade frente a bactéria gram-positiva, *S. Aureus*. Novos testes são necessário para determinar a Concentração Inibitória Mininima (CIM) desta nova molécula.

Esta pesquisa apresentou resultados que poderão ser usados como indicador nas busca de novos antibióticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas



Gerais- FAPEMIG pela Bolsa de Iniciação Científica concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

ANVISA, A. N. D. V. S. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada - Oitava Edição 2003.

Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15° Suplemento Informativo 2005.

Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 50 2011.

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.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária**. Roca. São Paulo 1996.

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, , 10ª 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.

PERLOVICH, G. L., V. P. KAZACHENKO, *et al.* **Impact of Sulfonamide Structure on Solubility and Transfer Processes in Biologically Relevant Solvents**. **Journal of**

Chemical & Engineering Data, v.59, n.12, 2015/02/23, p.4217-4226. 2014.

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.

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.