ATIVIDADE DE DERIVADOS DE BENZOHIDRAZIDAS EM *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*

Thiago David de Freitas Rodrigues[1] (PIC-UEM), Liliani Aparecida da Silva[1], Gustavo Henrique de Souza[1], Fábio Vandressen[2], Vera Lúcia Dias Siqueira[1], Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli[1] (Orientadora) .
e-mail:katianyrcf@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR. Departamento de Química /Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Área: Ciências Biológicas - subárea: Bacteriologia

Palavras-chave: Benzohidrazidas; Infecção bacteriana; Antimicrobiano

Resumo

Infecção hospitalar causada por *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* vem sendo um problema hospitalar no que diz respeito ao surgimento de resistência bacteriana aos fármacos disponíveis no mercado atual. Neste sentido, a busca por novas opções de compostos com atividade antimicrobiana se faz necessário. Substâncias sintéticas, tal como as benzohidrazidas, têm se mostrado promissoras devido as suas atividades antiinflamatórias e antimicrobianas. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de derivados inéditos de benzohidrazidas em cepa padrão de *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Para isso, a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo para ambas as bactérias. Os compostos 3, 4 e 5 apresentaram atividade com CIM de 62,5 µg/mL para *P. aeruginosa.* No caso de *E. faecalis* todos os compostos apresentaram CIM>500 µg/mL. Esta triagem inicial dos derivados de benzohidrazidas nos encorajou para a realização de novos estudos a fim de ampliar os conhecimentos acerca da utilização de substâncias sintéticas no tratamento de infecções bacterianas.

Introdução

As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* apresentam características peculiares. *P. aeruginosa* se apresenta como um bacilo flagelado gram-negativo aeróbio, não fermentador e que não produz esporos (FIGUEIREDO et al 2007). Apresenta mínimas exigências nutricionais (DUNN et al. 1995). Esta espécie habita o solo, água e vegetais; é comumente encontrada como oportunista no ambiente hospitalar, uma vez que causa doença em indivíduos imunocomprometidos (SILVA, 1999; MURRAY et al., 2000).

E. faecalis são bactérias gram-positivas, geralmente encontradas no trato intestinal e no trato genital feminino; aproximadamente 14 espécies são descritas. Atualmente, as terapias contra *E. faecalis* tem sido limitada, uma vez que o microrganismo vem adquirindo resistência aos grupos de fármacos já existentes no mercado, como por exemplo a vancomicina, fármaco de referência para tratamento desse patógeno.
As infecções hospitalares têm sido um grande problema para a saúde pública brasileira, ocasionada por microrganismos resistentes à multi-fármacos. Dentre as bactérias de importância hospitalar, destacam-se *P. aeruginosa* e E. *Faecalis.* A resistência bacteriana contra os antimicrobianos tem sido observada devido à administração errônea e o abandono aos fármacos durante o período de tratamento.
Neste contexto, a busca por novas opções terapêuticas para o tratamento destas infecções bacterianas é de suma importância para a saúde pública. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de derivados inéditos de benzohidrazidas em cepa padrão de *P. aeruginosa* e *E. faecalis*.

Materiais e métodos

Os 19 derivados da benzohidrazida foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fábio Vandresen do Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Os compostos foram testados em *P. aeruginosa* (ATCC: 27853) e *E. faecalis* (ATCC: 29212).
A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo usando Muller Hinton Broth com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) seguindo recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). A leitura foi realizada com auxílio do revelador cloreto 2,3,5-trifenilterrazolio (TTC) a 2%.
O antibiótico ciprofloxacino (SIGMA Aldrich) na concentração de 4.096µg/mL foi utilizado como controle das reações conforme orientações do CLSI. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e repetidas em dias diferentes.

Resultados e Discussão

Estudos têm mostrado que adicionar elementos metálicos aos derivados de benzohidrazidas influência na sua capacidade antimicrobiana. Isso pode ser observado para os compostos 3, 4 e 5 com CIM de 62,5µg/mL para *P. aeruginosa* (Tabela 1). Por outro lado, esta melhora na atividade não foi observada em *E. faecalis*, onde para todos os compostos a CIM foi >500 µg/mL. Esta seletividade da atividade também chamou a atenção quando estudado estes compostos em micobactérias.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos derivados de benzohidrazidas em três diferentes cepas bacterianas

Compostos	CIM (µg/mL)			IC_{50}	Índice de Seletividade
	Pseudomonas aeruginosa	*Enterococcus faecalis*	*Mycobacterium tuberculosis**		
R1	>500	>500	>500	ND	ND
R2	>500	>500	>500	ND	ND
R3	>500	>500	>500	ND	ND
R4	>500	>500	>500	ND	ND
R5	>500	>500	>500	ND	ND
R6	>500	>500	>500	ND	ND
1	>500	>500	31,25	53,5±3,5	1,7
2	>500	>500	250	45,0±5,0	0,2
3	>500	62,5	7,8	22,7±3,4	2,9
4	>500	62,5	7,8	18,5±0,5	2,4
5	>500	62,5	>1000	92,5±12,5	ND
8	>500	>500	125	55,7±9,9	ND
10	>500	>500	31,25	117,5±7,5	3,8
11	>500	>500	125	127,5±7,5	1,0
13	>500	500	31,25	89,5±0,5	1,4
Ciprofloxacino	0,25	0,25	ND	ND	ND

*Dados obtidos e gentilmente cedidos pelas alunas Eloísa Sampiron e Liliani Silva.
IC_{50}: Concentração que inibiu 50% das células Vero; Índice de Seletividade: IC_{50}/CIM; *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 27853; *Enterococcusfaecalis* ATCC: 29212; Fármaco de referência nas reações: Ciprofloxacino. ND: não disponível.

Os mesmos compostos utilizados no presente estudo também foram previamente testados contra *Mycobacterium tuberculosis* por nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Bacteriologia Médica, da Universidade Estadual de Maringá, cujos resultados foram representados na tabela 1 a fim de propiciar uma discussão mais ampla acerca da atividade antibacteriana desses compostos. Com isso, pode-se observar que a CIM dos compostos contra *M. tuberculosis* foi mais promissora.
Tendo em vista o espectro de atividade mais seletivo contra *M. tuberculosis*, em relação à célula do hospedeiro (Índice de seletividade, Tabela 1) e a melhor atividade neste bacilo comparado com *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, os dados evidenciam a possibilidade de utilização desses compostos no tratamento da tuberculose, com pouca interferência na microbiota do indivíduo.

Novos derivados deverão ser sintetizados na tentativa de melhorar a atividade contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. No entanto, com esta triagem inicial também deverá ser ampliada para outras bactérias a fim de avaliar a ação bactéria-seletiva, o que se mostra bastante interessante do ponto de vista microbiológico.

Conclusões

Devido à prevalência crescente de diversas bactérias multirresistentes aos fármacos disponíveis, constituindo este um problema sério de saúde pública, a busca por novas alternativas que superem a resistência aos antimicrobianos clássicos é de primordial importância. Neste contexto, a triagem inicial dos derivados de benzohidrazidas nos alerta para que novos estudos sejam conduzidos a fim de ampliar os conhecimentos acerca da utilização de substâncias sintéticas como possíveis alternativas terapêuticas no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* e *E. faecalis* bem como contra micobactérias.

Agradecimentos

Ao Departamento de Análises Clinicas (DAB – UEM) e principalmente ao Laboratório de Bacteriologia Médica por ceder seu espaço, nos proporcionando a oportunidade ao aprendizado.

Referências

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard**, tenth edition – CLSI document M07-A10. CLSI, Wayne, Pennsylvania; 2015.

DUNN M; WUNDERINK R. G. - **Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas* infection**. Clin Chest Med. 1995; 16(1): 95-109.

FIGUEIREDO E. A. P. - ***Pseudomonas aeruginosa*: Freqüência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE**. RBTI 2007;19(4):421-427.

SILVA R. F. - **A infecção hospitalar no contexto das políticas relativas à saúde em Santa Catarina**. Rev.Lat Am Enferm. 2003;11(1):108-14.

TIAGO, F. S. **Descrição teórica de complexos de metais de transição com ligantes hidrazona com potencial aplicação farmacológica.** Dissertação de doutorado. Universidade de Brasília, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química. 2015.