

AValiação DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TIOSSEMICARBAZIDA DERIVADA DO (-)-CANFENO POR CINÉTICA DE MORTE BACTERIANA

Pedro H Rodrigues Amaral (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Beatriz Cardoso de Freitas, Bruna Renata Silva, Renata Zacanini Milani, Fábio Vandressen, Regiane Bertin de Lima Scodro, Rosilene Fressatti Cardoso, Vera Lucia Dias Siqueira (Orientadora), e-mail: vldsiqueira@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas - 2.00.00.00-6
Subárea: Microbiologia Médica - 2.12.02.01-0

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. *Enterococcus* spp. Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno.

Resumo

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm se tornado um problema de saúde pública devido ao aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos e a consequente diminuição das opções terapêuticas. A multirresistência tem levado a busca por novas opções de tratamentos e novos compostos com atividade antimicrobiana. Um derivado do (-)-canfeno, promissor na investigação clínica contra agentes infecciosos, tem sido a tiossemicarbazida, com estudos mostrando atividade antifúngica e antituberculosa. Os ensaios de curva de morte são utilizados para avaliar a ação bactericida de novas substâncias, já que permite uma análise dinâmica da interação entre a nova substância e o microrganismo. Diante disso, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade de tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) por cinética de morte bacteriana contra cepas-padrão e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Em *S.aureus* TSC demonstrou uma ação bactericida nas concentrações de 499,2 µg/mL para a cepa-padrão e 249,6 µg/mL para o isolado clínico, sendo oito e quatro vezes acima da concentração inibitória mínima (CIM), respectivamente. Em *E. faecalis* TSC apresentou ação bactericida em concentração de 62,4 µg/mL, duas vezes acima da CIM para a cepa padrão e de 249,6 µg/mL, 16 vezes a CIM, para o isolado clínico. Este estudo demonstrou que a TSC inibe o crescimento e apresenta ação bactericida sobre cepas-padrão e isolados clínicos das duas espécies bacterianas Gram positivas mais comumente envolvidas em IRAS.

Introdução

As infecções bacterianas, em especial as relacionadas à assistência à saúde (IRAS), tornaram-se um problema de saúde pública devido às limitadas opções terapêuticas, consequentes especialmente da resistência bacteriana aos antimicrobianos (BARTASHA, NORI, 2017). Dentre as bactérias mais comumente associadas às IRAS, destacam-se as Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e

Enterococcus spp. multirresistentes. Para tratamento de pacientes com IRAS por MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), a vancomicina representa uma das poucas opções terapêuticas. No caso de infecções por *Enterococcus* spp., as opções podem ser ainda mais diminuídas devido ao grande número de isolados resistentes à vancomicina (VRE – *Vancomycin-Resistant Enterococcus* spp.), A multirresistência tem levado a busca por novas opções de tratamento (BARTASHA, NORI, 2017) e a avaliação de novos compostos com atividade antimicrobiana continua sendo de grande importância.

As inúmeras atividades biológicas envolvendo substâncias derivadas do canfeno, descritas na literatura, têm atraído os pesquisadores para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial antibacteriano e ação contra multirresistentes. Um derivado do (-)-canfeno promissor na investigação clínica contra agentes infecciosos tem sido a tiossemicarbazida (TSC), com estudos mostrando atividade anti-fúngica e antituberculosa (YAMAGUCHI et al., 2009; SOUZA et al., 2018). Estudos preliminares realizados em nosso laboratório mostraram uma importante ação inibitória da TSC sobre o crescimento de bactérias Gram positivas, inclusive contra isolados multirresistentes (dados não publicados).

O ensaio de curva de morte pode ser utilizado para avaliar a ação antibacteriana de novas substâncias, uma vez que, permite uma análise dinâmica da interação entre a nova substância e o microrganismo. Dependendo da concentração empregada, geralmente aquelas acima da concentração inibitória mínima (CIM), essa metodologia permite inferir se a nova substância tem ação bactericida ou bacteriostática (SIQUEIRA et al., 2014). Diante disso, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana da substância química TSC por cinética de morte bacteriana, contra cepas-padrão e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Materiais e métodos

Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) previamente caracterizada (YAMAGUCHI et al., 2009) foi sintetizada como descrito por Souza et al. (2018) e gentilmente fornecida pelo professor Fabio Vandresen do departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) *campus* Londrina. A TSC foi diluída em dimetilssufóxido (DMSO) para obter solução estoque de concentração igual a 10.000 µg/mL.

Foram testadas cepas-padrão (*Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212) e isolados clínicos de *S. aureus* (IC 1008) e *Enterococcus* spp. (IC 886), provenientes da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e os ensaios de curva de tempo-morte foram realizados para todos os isolados bacterianos segundo Siqueira et al., 2014. A TSC foi testada em concentrações entre 0,125 a 16 vezes a CIM. Todos os ensaios incluíram um controle de crescimento sem o composto. O inóculo bacteriano inicial utilizado foi de 10⁵ UFC/ml. Os tubos com crescimento bacteriano, expostos ou não à TSC foram continuamente agitados numa incubadora orbital a 35 °C. Alíquotas (0,1 mL) foram removidas a 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h e diluídas

em série em solução salina estéril para a retirada do composto antimicrobiano. Posteriormente, 20 µl de cada diluição foram imediatamente inoculadas em ágar triptico de soja (TSA; Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) em triplicata. As placas foram incubadas a 35 °C durante 18 a 24 h para contagem de colônias. O limite inferior de detecção foi de 50 UFC/ml. Todos os ensaios de curva de morte foram realizados em duplicata. Os dados de pelo menos dois experimentos independentes foram calculados em média e plotados como log₁₀ UFC/ml versus tempo (h) para cada ponto de tempo ao longo de 24 h.

Resultados e Discussão

A substância TSC apresentou uma importante ação inibitória sobre o crescimento das bactérias testadas, com CIM variando de 15,6 a 62,4 µg/mL (Tabela 1).

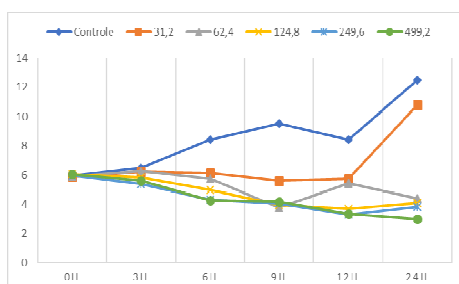
No ensaio de curva de morte a ação bactericida de uma substância é definida como uma redução $\geq 3\text{-log}_{10}$ no número de UFC/mL (SIQUEIRA et al., 2014). A TSC demonstrou ação bactericida sobre a cepa-padrão ATCC de *S. aureus* (Figura 1A) na concentração de 499,2 µg/mL, sendo oito vezes superior a CIM de 62,4 µg/mL, com um declínio, embora pequeno, mas gradual a partir da sexta hora da curva. Frente ao isolado clínico de *S. aureus* (Figura 1B) a substância apresentou ação bactericida na concentração de 249,6 µg/mL, sendo quatro vezes acima da CIM, com uma redução logarítmica gradual e significativa a partir da terceira hora. Em *E. faecalis* a TSC apresentou uma ação bactericida sobre a cepa-padrão (Figura 1C) em uma concentração de 62,4 µg/mL, ou seja, duas vezes superior a CIM, com um declínio gradual e significativo a partir da sexta hora. Frente ao isolado clínico de *E. faecalis* (Figura 1D) a TSC demonstrou uma ação bactericida na concentração de 249,6 µg/mL, sendo 16 vezes acima da CIM, com um declínio pequeno, mas gradual a partir da terceira hora.

Tabela 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da substância tiossemicarbazida derivada do (-) -canfeno (TSC) frente cepas-padrão (ATCC) e isolados clínicos (IC) de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

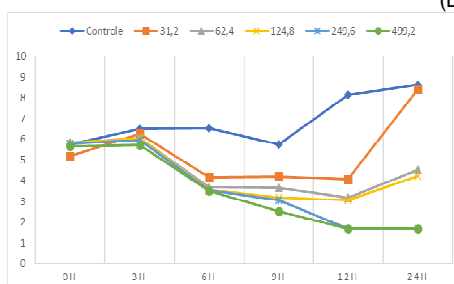
Substância TSC	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>S. aureus</i> IC 1008	<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	<i>E. faecalis</i> IC 886
	CIM (µg/mL)			
	62,4	62,4	31,2	15,6

ATCC: American type culture collection

(A)



(B)



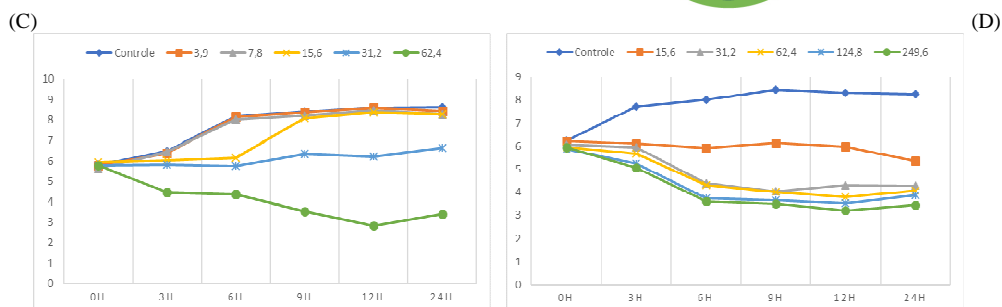


Figura 1: Curva de tempo-morte de diversas concentrações de tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) contra (A) cepa-padrão ATCC® 29213 e (B) isolado clínico 1008 de *S. aureus*, ambos com CIM de 62,4 µg/mL. (C) cepa-padrão ATCC® 29212 e (D) isolado clínico 886 de *E. faecalis* com CIM de 31,2 µg/mL e 15,6 µg/mL, respectivamente.

Conclusões

Os resultados deste estudo indicam que a substância química TSC tem uma ação bactericida sobre cepas-padrão e isolados clínicos de *S. aureus* e *E. faecalis*. Embora mais estudos devam ser realizados esta substância pode representar importante alternativa na terapia de infecções por estas bactérias.

Agradecimentos

Agradeço ao laboratório, a minha orientadora e ao CNPq que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto.

Referências

BARTASHA, R.; NORI, P. Beta-lactam combination therapy for the treatment of Staphylococcus aureus and Enterococcus species bacteremia: A summary and appraisal of the evidence. **Int J Infect Dis.** 2017. Oct;63:7-12. doi: 10.1016/j.ijid.2017.07.019.

SIQUEIRA, V. L. D. et al., Structural Changes and Differentially Expressed Genes in Pseudomonas aeruginosa Exposed to Meropenem-Ciprofloxacin Combination. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n.7, p. 3957-3967, 2014.

SOUZA, M. R. P.; Coelho, N. P.; Baldin, V. P.; Scodro, R. B. L.; Cardoso, R. F.; Silva, C. C. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Nat Prod Res.** 2018; 24:1-6.

YAMAGUCHI, M. U.; Da Silva A. P. B.; Ueda-Nakamura, T.; Filho B. P. D.; Da Silva, C. C.; Nakamura, C. V. Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on Trichophyton mentagrophytes. **Molecules.** 2009; 14(5): 1796-807.