

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE AROIL-ACETONITRILA EM CULTURAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Elis da Silva Araujo (IC) e Jan Carlo Morais Oliveira Bertassoni Delorenzi (Orientador).

**Apoio:** PIVIC Mackenzie

### **Resumo:**

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* causadora de uma grande resistência bacteriana devido a aspectos intrínsecos e extrínsecos, natural e adquirido exposto a uma grande variedade de fármacos atualmente no mercado, ocasionando alto índice de infecção hospitalar. Dados mundiais demonstram altas taxas de morbidade e mortalidade no organismo infectado, um problema de saúde pública que atinge vários países. Considerado um fator limitante ao tratamento da infecção bacteriana causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* o que impulsiona novas pesquisas no desenvolvimento de novos fármacos examinando a potencialidade das novas drogas contra o microrganismo, no presente trabalho foram realizados testes com drogas derivadas de Aroil – Acetonitrila novas moléculas com sínteses químicas mais simples em relação às encontradas no mercado atual. Os testes foram realizados na forma de microdiluição seriada, consistindo em diferentes concentrações das drogas testadas, conforme resultados iniciais posterior método confirmatório em placas de ágar. Os resultados confirmam a versatilidade da bactéria desde o início como um microrganismo multirresistente e no decorrer dos testes demonstrou a resistência adquirida à exposição de vários fármacos nas diferentes concentrações testadas. No entanto, foi evidenciada a sensibilidade da bactéria em determinados fármacos e concentrações diferentes testadas, em que a droga testada conseguiu manter e inibir a ação da bactéria.

**Palavras-chave:** Resistência bacteriana. Agente infeccioso. Antimicrobiano.

### **Abstract:**

*Pseudomonas aeruginosa* causes high bacterial resistance due intrinsic and extrinsic aspects, natural and acquired exposed to a wide variety of drugs currently on the market, causing a high rate of nosocomial infection. Worldwide data show high morbidity and mortality rates in the infected organism, a problem of public health that reaches many countries. Considered as a limiting factor to the treatment of bacterial infection caused by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* which drives new research in the development of new drugs. In the present work tests were performed with drugs derived from Aroil-

Acetonitrile, new molecules with simpler chemical syntheses compared to those found in the current market. The tests were performed in the form of serial microdilution, consisting of different concentrations of the drugs tested, according to initial results after confirmatory method on agar plates. The results confirm the versatility of the bacterium from the outset as a multi-resistant organism and during the tests demonstrated the acquired resistance to exposure of various drugs at different concentrations tested. However, the sensitivity of the bacteria to certain drugs and different concentrations tested was evidenced, and the tested drug was able to maintain and inhibit the action of the bacteria.

**Keywords:** Bacterial resistance. Infectious agent. Antimicrobial.

## 1. Introdução

### 1.1. Problema de Pesquisa

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é considerado um dos microrganismos mais versáteis que existem, pois são encontrados em diversos ambientes como no solo, na água, nos vegetais, nos animais, nos alimentos e ambiente hospitalar. Segundo Lincopan e Trabulsi, (2008) geralmente não causa infecção em indivíduos saudáveis, porém em indivíduos com sistema imunológico comprometido é um dos principais agentes infecciosos existentes, já que é considerado um patógeno oportunista.

Essa bactéria destaca-se como uma grande responsável pelas infecções hospitalares causadoras de Pneumonias e está associada com outras patologias. Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção caracterizada por resistência aos antimicrobianos padrões, constituindo-se um fator limitante ao tratamento a resistência, consequência direta da expressão dos fatores de virulência, ou seja, a sua capacidade de multiplicação no organismo infectado, na produção de toxinas, ocasionando efeitos graves e às vezes fatais no organismo do hospedeiro (LINCOPAN E TRABULSI, 2008).

As infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, afetam diferentes órgãos e tecidos, os seus fatores de virulência são diversificados e encontrados em grande número. Alguns fazem parte da estrutura intracelular da bactéria e outros são fatores extracelulares. A infecção hospitalar constitui um sério problema de saúde pública, principalmente porque contribui para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados, além de aumentar o tempo de internação destes pacientes e conseqüentemente o custo do tratamento (JARVIS, 1987).

Os estudos regularmente no Brasil e no exterior comprovam e caracterizam a *P. aeruginosa* como um importante patógeno nos casos de infecção hospitalar. Em 1996 o sistema NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance), conduzido pelo programa de infecções hospitalares do CDC (Centers For Disease Control and Prevention), nos Estados Unidos descreveu a *P. aeruginosa* como a principal causadora de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com a pneumonia em Unidades de Terapia Intensiva (RICHARDS *et al.*,1999).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil também são preocupantes onde demonstram elevado índice de infecção causado pela *P. aeruginosa*. Estudos realizados pelo SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program) responsável pelos países da América Latina, direcionados a pacientes hospitalizados avaliaram 3.728 isolados, obtidos de doze centros hospitalares de quatro estados e a *P. aeruginosa* foi responsável por 496 casos (13.3%) considerado o terceiro patógeno mais frequente (SADER, *et al.* 2001). Já o MYSTIC

(Meropenem Yearly Susceptibility Information Collection) específico para UTI, avaliou 1.550 amostras de bactérias Gram-negativas, provenientes de 20 centros hospitalares e *P. aeruginosa* estava envolvido em 30.3% (470 isolados) das infecções da corrente sanguínea, cateter, trato respiratório, trato urinário e pele (KIFFER *et al.*, 2005).

Esse microrganismo pode apresentar resistência natural ou adquirida a grande número de antibióticos utilizados na prática clínica (LIVERMORE, 2002). Segundo Lincopan e Trabulsi (2008) nos processos infecciosos por *P. aeruginosa*, antibióticos como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, tem sido os mais utilizados devidos a sua eficácia, segurança, maleabilidade e versatilidade química, quanto ao espectro de atividade e ação sinérgica. Entretanto, em consequência do amplo uso destes compostos, tem-se observado um alto índice de resistência por cepas de *P.aeruginosa*.

### **1.2. Justificativa**

A pesquisa se baseia em um teste antimicrobiano da droga de derivadas de Aroil-Acetonitrila, sob segredo industrial, resultante de parceria da Universidade Presbiteriana Mackenzie com a Nogueira Química e Biológica.

A alta resistência a drogas antimicrobianas atuais e que não encontra semelhança química com as drogas utilizadas atualmente no mercado, impulsionam a pesquisa de moléculas inovadoras e de síntese química mais simples. Além disso, é desejável que tais moléculas tenham a contra cepas resistentes.

### **1.3. Objetivo**

Avaliar a atividade antimicrobiana moléculas sintéticas derivadas de Aroil-Acetonitrila contra *Pseudomonas aeruginosa*.

## **2. Referencial teórico**

Bactérias são organismos unicelulares, procariontes, não possuem núcleo celular individualizado e possuem constituição celular relativamente simples.

Segundo um dos primeiros autores a mencioná-las (PALLERONI *et.al.* 1973) sua constituição continua atualmente aceito como um microrganismo pertencente à família Pseudomonadaceae é caracterizado como um bastonete Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo e pode ser observado como células isoladas, aos pares ou cadeias curtas, revelando mobilidade através do flagelo. Bactérias classificadas como Gram-negativo são mais complexas estruturalmente como quimicamente em comparação com as bactérias Gram – positiva.

Bactérias Gram-negativas possuem uma camada de membrana celular onde é repousada externamente uma fina camada de peptidoglicano (proteínas e açúcar) e acima

há uma membrana externa diferente de qualquer outra biológica. Seu folheto inferior é composto por fosfolipídio e a região superior por lipopolissacarídeo. Essa membrana confere uma importante barreira de permeabilidade a grandes moléculas. Entre a membrana plasmática interna e a externa há uma região denominada espaço periplasmático, onde situam importantes componentes de transporte de nutrientes e enzimas como beta lactamases para espécies patogênicas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Segundo Lincopan e Trabulsi (2008), fisiologicamente é classificada como uma bactéria aeróbia, podendo crescer anaerobicamente utilizando nitrato em substituição ao oxigênio como um acceptor terminal de elétrons. Embora a bactéria seja quimiorganotrófica, isto é, obtém a fonte de energia através da matéria orgânica, a obtenção de energia através dos carboidratos implica em um metabolismo oxidativo, dependente de oxigênio, o que define a sua inclusão nos microrganismos não fermentadores de carboidratos. Para compensar é utilizada outra fonte de carbono como o acetato.

Esta versatilidade nos requerimentos nutricionais e energéticos permite-lhe crescer em meios muito simples, isolando-a em vários meios de cultura utilizados em laboratórios, em temperaturas que variam entre 37°C e 42°C.

## 2.1 Mecanismos de Virulência

A infecção bacteriana consiste no processo de penetração da bactéria através das barreiras cutâneas ou mucosas do hospedeiro alcançando tecidos corporais onde produzem substâncias danosas. Caso não haja manifestação clínica de sintomas, significa que o sistema imunológico combateu o antígeno eficazmente, caso contrário à bactéria se multiplique e desenvolva um quadro clínico com sinais inflamatórios é necessário tratamentos com substâncias que combata essa multiplicação (LULLMAN *et.al.* 2000).

A patogenicidade da *P. aeruginosa* mostra-se em diversos fatores como a aderência as células hospedeiras, produção de polissacarídeos, toxinas extracelulares, presença de lipopolissacarídeo de parede celular (endotoxina).

As fimbrias ou pili estendem-se a partir da superfície celular e promove à adesão da bactéria as células epiteliais. Segundo Lincopan e Trabulsi (2008), é a principal adesina associada à virulência, responsável por aproximadamente 90% da capacidade de adesão a algumas células.

O alginato é um polissacarídeo constituído pelos ácidos manurônico e glicurônico tem grande potencial de virulência (LINCOPAN e TRABULSI, 2008), o que promove a resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune, inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular de anticorpos (MAI *et.al.* 1993).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são responsáveis pela produção de choque tóxico, como a endotoxina que é um componente estrutural da parede da bactéria e sua presença é intrínseca em 100% das amostras de *P.aeruginosa*. Pode funcionar como um fator de virulência conferindo atividade imunoestimulante. Quando a bactéria morre ou sofre autólise da parede celular, ou seja, a destruição celular por liberação de enzimas no citoplasma o LPS é liberado e entrando em contato com outras moléculas é estimulada a produção de citocinas o que gera um aumento na produção de anticorpos no hospedeiro. Podendo promover uma adesão da bactéria aos tecidos pulmonares e a córnea (LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

Os fatores extracelulares de virulência que facilitam o rompimento da integridade epitelial, podemos citar as exoenzimas, exotoxina, proteases, fosfolipase C, pigmentos fenazínicos, biofilme (LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

As exoenzimas que são enzimas extracelulares, que são subdivididas em exoenzima S e exoenzima U cuja principal função é defender a bactéria da fagocitose mediada por neutrófilos e por macrófagos respectivamente.

A exotoxina, ou seja, substância tóxica isolada que a bactéria produz como o caso da exotoxina A que inibe a síntese proteica e são produzidas pelas maiorias das cepas de *P.aeruginosa* causando danos a tecidos e inibindo a ação de fagócitos.

As proteases (enzimas) produzidas por *P.aeruginosa* são responsáveis pelas lesões tecidual associadas à hemorragia e necrose. Possui ação na degradação da elastina uma proteína presente na parede vascular e tecido pulmonar, danificando o tecido pulmonar e os vasos sanguíneos o que facilita a disseminação da bactéria (LINCOPAN e TRABULSI, 2008). Causa também inativação da imunoglobulina (anticorpo) da classe IgG onde a função dos neutrófilos são inibidas, ou seja, causa interferência na resposta inflamatória e imunológica (produção de anticorpos).

A fosfolipase C lisa as células mediante a divisão dos fosfolípidios presentes na membrana, assim age para destruir o surfactante pulmonar (LINCOPAN e TRABULSI, 2008), que é uma mistura lipoproteica produzido por células chamadas pneumócitos cuja função é facilitar a troca de gases nos pulmões.

Os pigmentos fenazínicos são metabólitos produzidos por *P.aeruginosa* cuja função é inibir a epiderme humana e linfócitos do hospedeiro (LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

Os sideróforos (compostos orgânicos) consistem em um processo de captura de ferro do hospedeiro, pois o sistema de auto síntese bacteriano é inexistente (LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

O biofilme (comunidades de microrganismos) confere proteção contra o sistema de defesa do hospedeiro como linfócitos, fagócitos, ação ciliar do trato respiratório, anticorpos. Esse processo dificulta a ação dos antibióticos (LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

A importância clínica de *P. aeruginosa* está baseada na resistência natural e adquirida aos antibacterianos de uso habitual. Relacionam-se as atividades das moléculas resistentes a antibióticos que estas adquiriram com a exposição ao fármaco.

## 2.2. Ação antibacteriana dos antibióticos

A ação antibacteriana dos antibióticos pode ocorrer na parede celular, nesse caso esse grupo bloqueia a síntese da camada de peptidoglicano na parte externa da parede e os microrganismos são eliminados durante a divisão celular por lise das células pela entrada de água em seu interior (processo conhecido como osmose), devido à elevada pressão osmótica intracelular. Alguns integrantes desse grupo são os beta-lactâmicos Penicilinas e Cefalosporinas (LINCOPAN e TRABULSI, 2008).

A mesma ação das Penicilinas é encontrada em outros antibióticos também beta-lactâmicos. Cefalosporinas e Carbapenêmicos, atuando na inibição de enzimas da classe das chamadas proteínas fixadoras de Penicilina (penicilin binding protein ou PBP) que participam da síntese da parede celular (LINCOPAN e TRABULSI, 2008). As PBPs possuem ação transglicosidase (insere monômeros de peptidoglicano na síntese da camada de peptidoglicano), transpeptidase (faz ligação peptídica entre oligoproteínas que ligam as cadeias de peptidoglicano) e carboxipeptidase (removem o monômero de peptidoglicano livres para limitar a extensão da parede celular) (BAPTISTA, 2013).

Há várias gerações de Penicilinas e Cefalosporinas em que os primeiros derivados possuem ação em bactérias específicas como o caso da *P.aeruginosa* e as gerações posteriores houve maior espectro e poder de neutralização de bactérias resistentes produtoras de beta-lactamases (fator de resistência) (BAPTISTA, 2013). Essa enzima beta-lactamase, hidrolisa o grupamento beta-lactâmico bloqueando sua ação. Portanto, as novas gerações desta droga surgiram com inibidores de beta-lactamase, como as meticilinas (BAPTISTA, 2013); (BARREIRO e FRAG, 2008). Os carbapenêmicos são mais resistentes à hidrólise das maiorias das beta-lactamases e possuem um espectro maior de atividade. Fazem parte deste último grupo os antibióticos Imipenem e Meropenem (POSSEBON e CAMARGO; 2003).

Os derivados de Aroil - Acetonitrila (ACN) também conhecida como cianeto de metila será uma nova droga testada para verificar a sua potencialidade mediante a resistência da bactéria *P.aeruginosa*. A matéria prima possui fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{CN}$ , consistindo em um

líquido incolor, odor aromático e é considerado o citrilo orgânico mais simples e menos denso que a água.

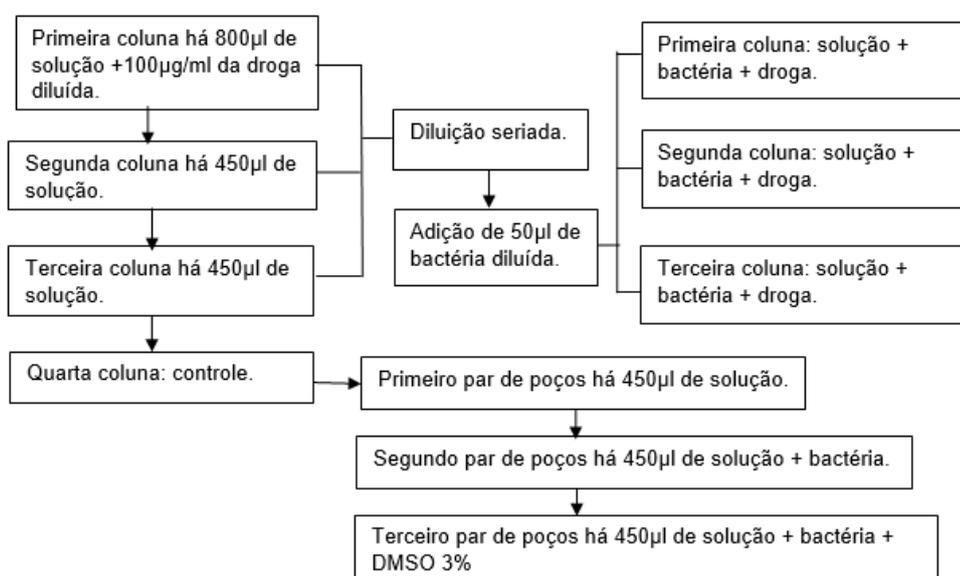
### 3. Metodologia

Procedimento utilizado para realização de testes de sensibilidade bacteriana, em microdiluição seriada conforme objetividade do teste verifica-se a potencialidade da droga, pois serão testadas em concentrações diferentes.

As cepas utilizadas encontram-se congeladas em criotubos e para utilização nos testes são descongeladas, utilizando alça bacteriológica uma quantidade de bactérias são transferidas para placa de Petri meio MacConkey, este meio é amplamente utilizado para identificação de bactérias Gram-negativa e o seu caldo é preparado seguindo instruções do fabricante. As placas são incubadas em estufa +/- 37°C por aproximadamente 24h, as cepas selecionadas são analisadas conforme seu crescimento e alteração metabólica.

Em um fluxo laminar são utilizadas placas de microdiluição de fundo chato cada placa possui 24 poços onde é identificado com o nome da bactéria a ser testada nesse caso *P. aeruginosa*, o nome da droga e sua concentração. Os testes são realizados em poços duplicata como parâmetro, em que os dois devem apresentar resultados iguais.

O fluxograma a seguir (Figura 1) demonstra as etapas dos testes realizados.



Na primeira coluna horizontal são adicionados 800µl de solução em cada poço que nesse caso é o meio de cultura líquido MacConkey, na segunda e terceira coluna horizontal é adicionado 450µl de solução respectivamente e na quarta coluna horizontal será o controle onde é adicionado 450µl de solução.

Posteriormente, adiciona-se quantidade específica de 100µg/ml da droga previamente diluída nos poços da primeira coluna horizontal, totalizando 900µg/ml (meio + droga). Essa diluição dos derivados de Aroil - Acetonitrila é obtida da concentração de 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml, que sofreram alterações quantitativas conforme recomendação do orientador tendo o projeto permanecido até o final com estas concentrações de drogas.

O cálculo obtido consiste na diluição de um solvato no caso a droga ocorrendo a partir de 50mg de seu pó em 1 ml de solvente nesse caso o Dimetil-sulfóxido (DMSO) a 3%, cuja finalidade é diluir a droga e o DMSO nessa concentração não apresenta-se tóxico para inibir o crescimento bacteriano, após as drogas são armazenados em um refrigerador em criotubos.

Em seguida realiza-se o método de diluição seriada na placa utilizando pipeta micrométrica, que consiste em retirar 450µl de solução dos poços da primeira coluna horizontal e são transferidos para os poços da segunda coluna e 450µl dos poços da segunda coluna para os poços da terceira coluna e 450µl dos poços da terceira coluna para respectivo descarte, realiza-se descarte da ponteira utilizada para cada poço. O processo resultará no igualamento da quantidade de solução de todos os poços da placa.

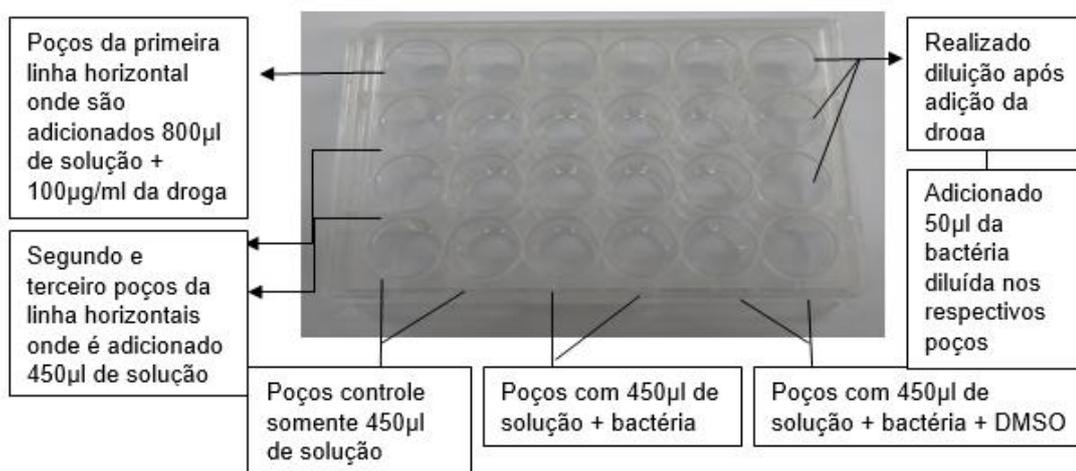
A quarta coluna é o grupo controle e nesse não realiza diluição. No primeiro par de poços é adicionado somente 450µl do meio de cultura líquido MacConkey e no segundo par de poços além do meio de cultura líquido MacConkey adiciona 50µg/ml da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. No terceiro par de poços são adicionados 450µl do meio líquido MacConkey, 50µg/ml de bactéria e 50µl de DMSO a 3%.

Há necessidade de uma quantidade específica de bactérias para que as medidas sejam equivalentes entre droga e cepa, para isso é utilizado dois tubos de vidro esterilizados, no primeiro tubo adiciona-se 3000µl de água esterilizada e no segundo tubo adiciona-se 2970µl de água esterilizada. Essa água é esterilizada conforme protocolo estabelecido num processo chamado de autoclavagem em que a esterilização é obtida através da pressão do vapor da água a 120°C.

Utilizando alça bacteriológica transfere uma quantidade de bactérias ativadas numa placa de Petri para o primeiro tubo até total absorção, realizando comparação com a escala de MacFarland 0.5 onde a turvação da coloração deve ficar branco gelatinoso. A escala MacFarland 0.5 é utilizada para comparar a quantidade de bactérias a serem analisadas, quando o primeiro tubo atingir a quantidade equivalente pela escala, serão retirados do primeiro tubo 30µl do complexo de água mais cultura bacteriana e transferida para o segundo tubo totalizando 3000µl.

Deste segundo tubo com auxílio da pipeta retira-se 50µl da bactéria diluída onde é transferida para cada poço da placa correspondente atentando-se para não adicionar nos poços controle identificados somente com solução (Figura 2).

**Figura 2.** Placa de 24 poços com demonstração das etapas dos testes.



Fonte: Autora do trabalho.

Após as placas com a microdiluição completas são colocadas para incubar em estufa a 37°C num período de 24h. Posteriormente ao período de incubação procede-se a leitura dos resultados obtidos nas placas de cultura. A leitura é realizada nas placas de microdiluição a olho nu identificando o possível desenvolvimento bacteriano nos poços comparando com os poços controle de acordo com as concentrações das drogas utilizadas.

O grupo controle funciona como um indicador de que os resultados não foram de alguma forma comprometida, nos poços que contém apenas o meio de solução não deve haver crescimento bacteriano, caso contrário indica que o teste está invalidado, partindo do pressuposto de que não foram adicionadas bactérias nesses poços. Entretanto, nos poços com o meio de solução e bactérias deve haver crescimento bacteriano significando que o meio é propício ao crescimento das cepas e nos poços onde há o meio de solução, bactérias e DMSO deve haver crescimento bacteriano o que significa que a utilização de DMSO não interferiu no crescimento das bactérias.

Caso não ocorra crescimento bacteriano é realizado testes em placa de Petri em meio ágar MacConkey em que consiste transferir com auxílio da alça bacteriológica cultura do meio líquido da placa para o meio sólido passando em sentido diagonal. Essa placa é colocada em estufa a 37°C e o resultado é verificado em 24h, examinando o crescimento bacteriano, essa análise é denominado como análise de 48h do mesmo teste de sensibilidade e é confirmatório para potencialidade da droga sobre a bactéria.

#### 4. Resultado e Discussão

As análises de todos os poços em duplicata foram realizadas através dos poços meio controle por onde é examinado o crescimento ou inibição da bactéria. No par de poços somente com a solução MacConkey é observado que a coloração se apresenta de forma límpida considerada um resultado negativo para crescimento bacteriano, indicando que não houve algum tipo de interferência. Se o meio apresentar resultado positivo a coloração permanece turva, indicando crescimento bacteriano e os testes estão invalidados, não havendo possibilidade de realizar análise na placa de microdiluição, pois o meio está inadequado para comparação.

No par de poços onde há solução MacConkey e bactérias e no par de poços com solução, bactérias e DMSO 3% a coloração apresenta-se de forma turva indicando crescimento bacteriano.

Os resultados iniciais são obtidos em 24h e aqueles que demonstrou ser negativos para crescimento bacteriano foram confirmados em testes de 48h.

Os testes realizados com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* do Banco de Cepa 2017 e os resultados obtidos da sensibilidade antimicrobiana seguem conforme indicado na tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados dos testes das drogas utilizadas e suas concentrações em µg/ml. São Paulo, 2018.

Drogas	10	5	2,5	1,25	0,75	Resultado 48hr	10	5
AQ 1+2	+	+	+	+	+			
NEG 4	+	+	+	+	+			
NEG 1+2	+	+	+	+	+			
NEG 3	+	+	+	+	+			
NEG 5	+	+	+	+	+			
NEG 512	-	-	+	+	+		-	-
NEG 511	-	-	+	+	+		-	-

Meio: Negativo. Meio e Bactérias: Positivo. Meio, Bactérias e DMSO: Positivo.

Legenda. Símbolos: + (positivo) houve crescimento bacteriano.

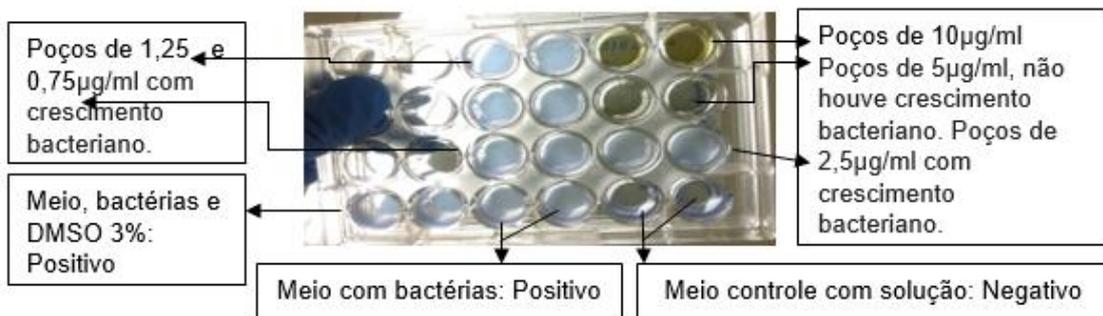
- (negativo) não houve crescimento bacteriano.

Foi possível analisar que as drogas utilizadas AQ 1+2, NEG 4, NEG 1+2, NEG 3 e NEG 5 nas concentrações de 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml, nos testes de 24h, evidenciam a resistência bacteriana ao tratamento antimicrobiano, havendo

crescimento da bactéria, indicado pelo símbolo (+). Não houve necessidade de realizar testes de 48h.

As drogas utilizadas NEG 512 e NEG 511, nas concentrações de 10µg/ml e 5µg/ml, nos testes de 24h, os resultados obtidos demonstraram que não houve crescimento bacteriano indicando que a bactéria é sensível ao tratamento antimicrobiano, pois seu desenvolvimento é inibido, indicado pelo símbolo (-). Entretanto, nas concentrações de 2,5 µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml, houve crescimento bacteriano, evidenciado a resistência ao tratamento antimicrobiano, (figura 3).

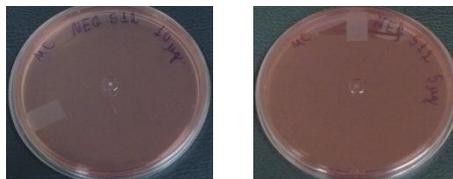
**Figura 3.** Resultado de 24h na placa de microdiluição seriada com antimicrobiano NEG 512.



Fonte: Autora do trabalho.

Realizado testes confirmatórios de 48h com NEG 511 e NEG 512 nas concentrações de 10µg/ml e 5µg/ml, onde foram confirmados os resultados negativos, não havendo crescimento bacteriano (figura 4). Na situação dos resultados se apresentarem positivos é identificado pela presença de bactérias nas placas com crescimento na forma isolada ou de colônias.

**Figura 4.** Resultados dos testes em 48h nas placas em ágar MacConkey.



Fonte: Autora do trabalho.

Resultados negativos de crescimento bacteriano com antimicrobiano NEG 512 em 10µg (á direita) e 5 µg (á esquerda).

Segundo Lincopan e Trabulsi (2008), a resistência ao tratamento antimicrobiano, indica que o tratamento será ineficaz com essas concentrações, tornando-se um problema no tratamento do organismo infectado. Ocorre no microrganismo uma resistência natural ou adquirida à droga utilizada (LIVERMORE, 2002), os fatores que interferem são da própria

constituição do microrganismo que se adapta a diferentes ambientes e a exposição às drogas, inibindo a ação do antimicrobiano tornando-o ineficiente.

Assim é possível identificar a facilidade com que a bactéria se torna um agente infeccioso multirresistente a diferentes drogas testadas.

Os testes realizados com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* do Banco de Cepa 2018 e os resultados obtidos da sensibilidade antimicrobiana seguem conforme indicado na tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados dos testes das drogas utilizadas e suas concentrações em µg/ml. São Paulo, 2019.

Drogas	10	5	2,5	1,25	0,75	Resultados 48 hr	10	5
AQ 1+2	+	+	+	+	+			
NEG 4	+	+	+	+	+			
NEG 1+2	+	+	+	+	+			
NEG 3	+	+	+	+	+			
NEG 5	+	+	+	+	+			
NEG 512	-	+	+	+	+		-	
NEG 511	-	-	+	+	+		-	-
Meio: Positivo Meio e Bactérias: Negativo Meio, Bactérias e DMSO: Negativo								

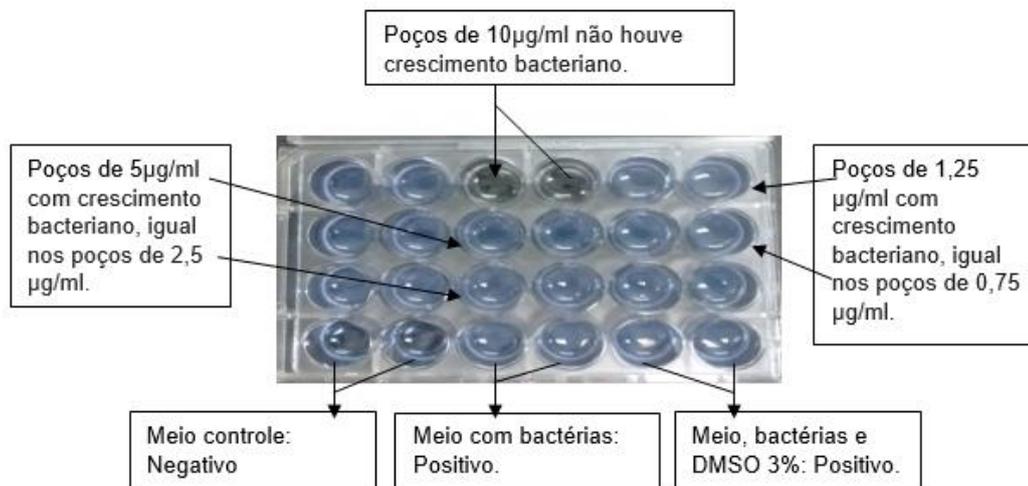
Legenda. Símbolos: + (positivo) houve crescimento bacteriano.

- (negativo) não houve crescimento bacteriano.

Os resultados obtidos com as drogas utilizadas AQ 1+2, NEG 4, NEG 1+2, NEG 3 e NEG 5 nas concentrações de 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml nos testes de 24h, demonstram a resistência bacteriana ao tratamento antimicrobiano, ocorrendo crescimento da bactéria e portanto não houve necessidade de realizar testes de 48h.

A droga utilizada NEG 512 na concentração de 10µg/ml, no teste de 24h o resultado obtido evidenciou que não houve crescimento bacteriano indicando que a bactéria é sensível ao tratamento antimicrobiano, pois é visualizado que seu desenvolvimento foi inibido. Porém, os resultados obtidos nas concentrações de 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml, em testes de 24h, verificou-se crescimento bacteriano, expressando a resistência ao tratamento antimicrobiano e não havendo necessidade de realizar testes de 48h (Figura 5).

**Figura 5.** Resultados de 24h na placa de microdiluição seriada com antimicrobiano NEG 512.



Fonte: Autora do trabalho.

Realizado teste de 48h com NEG 512 na concentração de 10µg/ml, confirmou o resultado negativo, não havendo crescimento bacteriano (Figura 6).

**Figura 6.** Resultado do teste em 48h na placa em ágar MacConkey.



Fonte: Autora do trabalho.

Resultado obtido com antimicrobiano NEG 512 na concentração de 10µg, negativo para crescimento bacteriano.

Realizando uma comparação com os testes realizados na bactéria do banco de cepa 2017 em que a droga NEG 512 na concentração de 5µg/ml, apresentou sensibilidade e no banco de cepa de 2018 resistência, evidencia que no primeiro banco de cepa citado é uma bactéria sensível para a droga e no segundo banco de cepa é uma bactéria resistente para a mesma droga e concentração. Isso se deve ao caso em que ambas são provenientes de extrações em locais diferentes

Segundo Lincopan e Trabulsi (2008) será um fator de resistência ao tratamento, em que o antimicrobiano não apresentará efeito de inibição a bactéria no organismo infectado, pois o microrganismo encontra meios de perpetuação utilizando mecanismos para inativar o efeito do antimicrobiano.

A droga utilizada NEG 511 nas concentrações de 10µg/ml e 5µg/ml, nos testes de 24h, o resultado obtido foi à sensibilidade microbiana, não havendo crescimento bacteriano e a

inibição foi confirmada pelos testes de 48h onde não ocorreu crescimento. No entanto, os testes de 24h nas concentrações de 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml, os resultados evidenciam a resistência bacteriana, identificando o seu crescimento.

## 5. Considerações Finais

A partir dos dados analisados pode-se concluir que as drogas de derivados de Aroil - Acetonitrila, AQ 1+2, NEG 4, NEG 1+2, NEG 3 e NEG 5 nas concentrações de 10µg/ml, 5 µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml, foram ineficazes para impedir o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*.

Por tratar-se de uma bactéria muito resistente envolvida em inúmeros casos de infecção adquirida e hospitalar, ocorre que a bactéria desenvolveu mecanismos de resistência e superou a ação das drogas testadas.

No entanto, a NEG 511 nas concentrações de 10µg/ml e 5µg/ml e a NEG 512 na concentração de 10µg/ml, apresentaram resultados satisfatórios, inibindo o crescimento bacteriano. Demonstra que a utilização apropriada e de forma racional tornará o tratamento eficaz no seu propósito de combater o agente infeccioso.

Nas concentrações de 2,5µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml de NEG 511 ocorre resistência bacteriana à droga, assim como na NEG 512 nas concentrações de 5µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25µg/ml e 0,75µg/ml. É possível afirmar com base nos resultados apresentados que NEG 511 e NEG 512 são drogas promissoras como antimicrobiano com ação em *Pseudomonas aeruginosa*.

## 6. Referências bibliográficas

BAPTISTA, M. G. F.; *Mecanismos de resistência aos antibióticos*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013. Disponível em: <recil.grupolusofona.pt/>. Acesso em: 27 mar. 2018.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A.; M. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

FERREIRA, L. L.; *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056>. Acesso em: 17 mar. 2018.

JARVIS, W. R.; *Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients*. *Pediat Infect Dis J*, v. 6, p. 344-351, 1987. FERREIRA, L. L.; *Estrutura clonal e multirresistência em*

*Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <[teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056](http://teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056)>. Acesso em: 17 mar. 2018.

KIFFER, C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gramnegative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 3, p. 216-24, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n4/v47n4a04.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R.; *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. et al. *MICROBIOLOGIA*. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-381.

LIVERMORE, D. M.; *Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?* *Clin Infect Dis*, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n4/v47n4a04.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

LULLMANN, H. et al. *Color Atlas of Pharmacology*. Nova York: Thieme, 2000.

MAI, G. T, et al. El.Supression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun*, v. 61, p. 559-564, 1993. FERREIRA, L. L.; *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <[teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056](http://teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056)>. Acesso em: 18 mar. 2018.

MURRAY, P. R, ET . *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) REPORT. Data summary from October 1986/April, Issued May 1996. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Geórgia, EUA. 1996. FERREIRA, L. L. *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <[teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056](http://teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056)>. Acesso em: 17 mar. 2018.

NEVES, P.R. et al. *Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil*. *Brasil: J Bras Patol Med Lab*, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n4/v47n4a04.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

PALLERONI, N.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol*, v. 23, p. 333-339, 1973.

FERREIRA, L. L. *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056>. Acesso em: 18 mar. 2018.

POLLACK, M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease on immunity. *Rev Infect Dis*, v. 5, p. 979-984, 1983.

FERREIRA, L. L. *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056>. Acesso em: 18 mar. 2018.

POSSEBON, M.; I.; CAMARGO, E.; A. Resistência bacteriana a carbapenêmicos. *Revista brasileira de Medicina, Brasil*, v.60, n.6, p.378-382, 2003. Disponível em: <<http://www.moreirajr.com.br/bavancada.asp?fase=2&key1=resistencia+bacteriana&cond>>. Acesso em: 28 mar.2018.

RICHARDS, M.J.; EDWARDS J.R.; CULVER D.H.; GAYNES R.P. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the Unites States. *National Nosocomial Infections Surveillance System. Pediatric*, v. 103, p. 39- 43, 1999.

FERREIRA, L. L. *Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa*. 2005. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2005. Disponível em: <teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056>. Acesso em: 17 mar. 2018.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis*, v. 5, n. 4, p. 200-14, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n4/v47n4a04.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

**Contatos:**

dena.li@hotmail.com e jan.bertassoni@mackenzie.br