

EFEITO DE COMPOSTOS PIRAZÓLICOS FRENTE A BACTÉRIAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

KAMILA FURTADO DA CUNHA¹; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ²; SUZANE OLACHEA ALLEND³; MARCELLE DE OLIVEIRA GARCIA⁴; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA⁵, DAIANE DRAWANZ HARTIWIG⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – trotadeborah@gmail.com;

³ Universidade Federal de Pelotas -suzane_olachea@yahoo.com.br

⁴ Universidade Federal de Pelotas- marcelle_garcia@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas -claudiochemistry@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As taxas de resistência bacteriana a diferentes fármacos são crescentes, representando uma das maiores causas de mortalidade e morbidade mundialmente. Com isso, infecções associadas a bactérias multirresistentes, necessitam de cuidados mais intensivos, internações hospitalares prolongadas e maiores custos de assistência à saúde (WHO, 2018).

De acordo com a *WORLD HEALTH ORGANIZATION* (WHO, 2018), as bactérias multirresistentes consideradas como prioridade crítica para pesquisa e desenvolvimento de novos antibacterianos, são: *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos. Outras bactérias, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), são consideradas como alta prioridade e, apesar de não constar na lista, *Staphylococcus epidermidis* emergiu nos últimos anos como um importante agente causador de infecção hospitalar, o qual vem destacando-se como um patógeno multirresistente (HEILMANN, ZIEBUHR e BECKER, 2018).

Considerando a necessidade da descoberta de novos fármacos mais eficientes, os pirazóis e seus derivados destacam-se por serem moléculas bioativas, possuindo propriedades farmacológicas, como ação antidepressiva, anticâncer, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiviral (KARROUCHI et al., 2018). São compostos heterocíclicos com dois átomos de nitrogênio adjacentes em seu anel de cinco membros, sendo considerado como um dos grupos de compostos mais estudados dentre a família dos azóis (KARROUCHI et al., 2018).

Além disso, a síntese desses compostos pode ser feita por química limpa, utilizando solventes renováveis, apresentando altos rendimentos e pureza, além das reações serem realizadas em pouco tempo (PIZZUTI et al., 2009). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de compostos derivados de pirazóis frente a bactérias de importância em infecções nosocomiais, como: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas duas moléculas sintéticas derivadas do composto pirazólico 1-tiocarbamoil-3,5-diaril-4,5-di-hidro-1H-pirazol 2a-2b, intitulados como BN03 e BN11. Os mesmos foram avaliados contra cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25904, *S. epidermidis* ATCC 35984, *A. baumannii* ATCC 19606 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-

organismos (LBMM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP), Instituto de Biologia (IB), Universidade Federal de Pelotas (UFPeI).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da Técnica de Microdiluição em Caldo como estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Foram feitas diluições de razão dois das moléculas em Caldo BHI (*Brain and Heart Infusion* – Kasvi®) variando de 1 a 1.024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em seguida foram adicionados 50 μL do inóculo bacteriano ($1,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹). Como controles foram utilizados o meio de cultivo, meio de cultivo acrescido do inóculo bacteriano, meio de cultivo acrescido das moléculas sintéticas pirazólicas teste e meio de cultivo acrescido de 20% de DMSO e inóculo. As placas foram incubadas a 36°C por 24h e os testes realizados em triplicata. Após o período de incubação, foram adicionados 10 μL do corante revelador Resazurina 0,02% (Sigma-Aldrich ®) em todas as cavidades. Para leitura o surgimento da coloração rosa indicou possível viabilidade celular bacteriana, sendo assim possível determinar a CIM.

Com base nos resultados obtidos na CIM, foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM), segundo CLSI, 2018. A partir dos poços onde houve inibição do crescimento bacteriano, foi coletada uma alçada para repique em ágar BHI e após o período de incubação de 16-18h à 36°C, foi verificado em quais concentrações as moléculas tiveram ação bactericida, indicada pela ausência do crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que nenhuma das moléculas sintéticas avaliadas apresentaram ação bactericida, dentre as concentrações testadas. A ação inibitória das mesmas foi observada apenas para as bactérias Gram-negativas utilizadas nos testes, sendo a CIM obtida na maior concentração avaliada (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antibacteriana de moléculas derivadas do 1-tiocarbamoil-3,5-diaril-4,5-di-hidro-1H-pirazol 2a-2b.

Cepa ATCC	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	BN03	BN11
<i>S. aureus</i> ATCC 25904	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	1.024	1.024
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	1.024	1.024

CIM: Concentração Inibitória Mínima; - : não detectado.

Semelhante aos nossos resultados, CHANDRAKATHA et al. (2012) demonstraram a ação de compostos pirazólicos frente a bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, entretanto os valores de CIM obtidos foram menores do que as encontradas em nosso estudo, sendo de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Diferente dos resultados obtidos em nosso estudo para bactérias Gram-positivas, *S. aureus* ATCC 25904 e *S. epidermidis* ATCC 35984, B'HATT E SHARMA (2017) relatam a ação de compostos pirazólicos contra *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Além disso, já foi descrito a ação desses compostos contra MRSA (RAHMIZADEH et al., 2010).

Estudos demonstram que as moléculas obtidas a partir de pirazóis apresentam ação *in vitro* contra diferentes micro-organismos. Dentre eles, espécies de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, (MERT et al., 2014), *Candida albicans* (B'BHATT e SHARMA, 2017), *Bacillus subtilis* (CHANDRAKANTHA et al., 2012) e *Mycobacterium tuberculosis* (AHSAN et al., 2011).

Apesar dos resultados apresentados aqui serem parciais e demonstrarem relevância apenas para bactérias Gram-negativas, os pirazóis e compostos que podem ser obtidos a partir deles demonstram-se bastante promissores com relação a suas propriedades farmacológicas. Em estudo realizado por ANH et al. (2017) avaliando peptídeos obtidos a partir de derivados dos aminoácidos N-alkil/aril-pirazol, foi observada a ação contra MRSA *in vitro*, sendo possível inferir que o mecanismo de ação foi na membrana celular, além de exibir também atividade anti-biofilme e anti-inflamatória.

Acredita-se que alterações na estrutura química dessas moléculas poderiam alterar suas propriedades biológicas, bem como, a associação com outros fármacos pode potencializar seus efeitos. Como demonstrado no estudo realizado por ANUSH et al. (2018), onde a combinação de quitosana com pirazóis foi mais eficiente na inibição de diferentes micro-organismos, dentre eles *K. pneumoniae* e *S. aureus*, quando comparados ao tratamento com as moléculas individualmente.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que as moléculas derivadas de pirazóis não demonstraram ação contra as cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25904 e *S. epidermidis* ATCC 35984, entretanto, apresentaram ação inibitória contra *K. pneumoniae* ATCC 700606 e *A. baumannii* ATCC. Contudo, considera-se importante a realização de mais testes a fim de melhor avaliar a ação desses compostos, sua combinação com antimicrobianos convencionais, bem como sua citotoxicidade para futura aplicação em fórmulas farmacêuticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNADA, N.; HASSANEEN, H.; KANDILE, N.; MIQDAD, O. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Pyrazole, Fused Pyrazolo[3,4-d]-pyrimidine and Pyrazolo[4,3-e][1,2,4]-triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives. **Molecules**, v. 13, p. 1501–1517, 2008.

ANH, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJASEKARAN, G.; KIM, E. Y.; LEE, S. J.; ANG, G.; CHO, K.; HYUM, J. K.; LEE, H. J.; JEON, Y. H.; KIM, N. H.; RYU, E. K.; SHIN, S. Y.; BANG, J. K. Pyrazole derived ultra-short antimicrobial peptidomimetics with potent anti-biofilm activity. **Europea Journal of Medicinal Chemistry**. v. 125, p. 551-564, 2017.

ANUSH, S. M.; VISHALAKSHI, B.; KALLURAYA, B.; MANJU, N. Synthesis of pyrazole-based Schiff bases of Chitosan: evaluation of antimicrobial activity. **Biological Macromolecules**. v.119, p. 446-452, 2018.

CLSI, 2018. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; M07 Approved Standard — 13th Edition.

B'BHATT, H.; SHARMA, S. Synthesis and antimicrobial activity of pyrazole nucleus containing 2-thioxothiazolidin-4-one derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, p. 1590–1596, 2017.

CHANDRAKANTHA, B.; ISLOOR, A.; SHETTY, P.; ISLOOR, S.; MALLADI, S.; FUN, H. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel ethyl 1-(N-substituted)-5-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate derivatives. **Medical Chemistry Research**, v. 21, p. 2702–2708, 2012.

HEILMAN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococcus virulent? **Clinical Microbiology and Infection**, p.1-10, 2018.

KARROUCHI, K.; RAD, S.; RAMLI, Y.; TAOUFIK, J.; MABKHOT, Y. N.; AL-AIZARI, F. A.; ANSAR, M. Synthesis and pharmacological activities of Pyrazole derivatives; A Review. **Molecules**, n. 23, v. 134, p. 1-85, 2018.

MERT, S.; KASIMOĞULLARI, R.; İCA, T.; COLAK, F.; ALTUN, A.; OK, S. Synthesis, structure activity relationships, and *in vitro* antibacterial and antifungal activity evaluations of novel pyrazole carboxylic and dicarboxylic acid derivatives. **European Journal of Medical Chemistry**, n.78, p.86-96, 2014.

PIZZUTI, L. PIOVESAN, L. A.; FLORES, A. F. C.; QUINA, F. H.; PEREIRA, C. M. P. Environmentally friendly sonocatalysis promoted preparation of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.16, p. 728-731, 2009.

RAGAVAN, R.V.; VIJAYAKUMAR, V.; KUMARI, N.S. Synthesis and antimicrobial activities of novel 1,5 -diaryl pyrazoles. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 45, p.1173–1180, 2010.

RAHIMIZADEH, M.; PORDEL, M.; BAKAVOLI, M.; REZAEIAN, S.; SADEGHIAN, A. Synthesis and antibacterial activity of some new derivatives of pyrazole. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 317–321, 2010.

WHO. World Health Organization. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics**. 2018.

WHO. World Health Organization. **Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, sex, by country and by region**, Geneva, 2018.