

## Efeitos antimicrobianos *in vitro* do composto pirazol frente a *Klebsiella Pneumoniae*

JORGE, C. C.<sup>1</sup>; RODRIGUES C. C.<sup>1</sup>; FRADE V. P.<sup>1</sup>; ALEIXO, A. A.<sup>1</sup>; HERRERA, K. M. S.<sup>1</sup>; MAGALHÃES, J. T.<sup>1</sup>; CHAGAS R. C. R.<sup>2</sup>; FERREIRA, J. M. S.<sup>1</sup>.

### RESUMO

Novos compostos sintetizados estão sendo utilizados em pesquisas com objetivo de descobrir fórmulas com propriedades terapêuticas. A *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno causador de infecções em ambientes comunitários e hospitalares, e nos últimos anos, tem apresentado resistência a antibióticos, como os carbapenêmicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do composto pirazol, frente à bactéria *K. pneumoniae*, tendo como resultado, a inibição bacteriostática na concentração de 125 µg/L. Dessa forma, conclui-se que os compostos sintéticos são novas perspectivas para a busca de drogas e que mais estudos devam ser realizados para esclarecer suas ação frente às bactérias.

**Palavras-chave:** *K. pneumoniae*, antimicrobiano, compostos sintéticos.

### INTRODUÇÃO

*Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno causador de infecções do trato urinário (ITU,) pneumonia, septicemias e infecções de tecidos moles, em ambientes comunitários e hospitalares, sendo que os principais reservatórios para a transmissão desse patógeno são o trato gastrointestinal e as mãos de profissionais de hospitais.<sup>1;2</sup>

Antibióticos da classe dos carbapenêmicos, como imipenem e ertapenem, têm sido amplamente utilizados em hospitais, no entanto, as estirpes clínicas resistentes aos carbapenêmicos, tais como *K. pneumoniae*,

começaram a surgir nos últimos anos.<sup>3;4</sup> A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) foi amplamente divulgada em todo o mundo entre os isolados de *K. pneumoniae* e identificada pela primeira vez nos Estados Unidos, em 2000, conferindo resistência a múltiplos antibióticos (especialmente aos carbapenêmicos), além da capacidade de tornar resistentes outras bactérias.<sup>5</sup>

O aumento significativo na resistência aos agentes antimicrobianos tornou-se uma grande preocupação para a saúde pública. A alta prevalência de multidrogas resistentes aos patógenos levou ao fracasso de tratamentos atuais e mortes de pacientes imunocomprometidos. A fim de lidar com este grave problema, que é considerado uma consequência do uso generalizado desses agentes, o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas ganhou grande importância.<sup>6</sup>

Frente à busca de novas drogas que sejam efetivas contra esta bactéria, um enfoque importante nas pesquisas terapêuticas é a triagem de compostos químicos por testes biológicos. Assim, as estruturas químicas com melhor atividade serão selecionadas para a realização de testes mais específicos. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do pirazol, um composto aromático pentagonal, frente à bactéria *K. pneumoniae*.<sup>7;8</sup>

### MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a bactéria *K. pneumoniae* ATCC 43816, proveniente do Laboratório de Imunofarmacologia – ICB/UFMG. Frente a esta bactéria, foi testado o composto aromático pirazol, cedidos pelo Professor Rafael César Russo Chagas, originários de uma quimioteca do Laboratório de Química Analítica. Esses compostos foram testados através do método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à *K. pneumoniae*.

Os testes foram realizados em dois momentos, um imediatamente após diluição dos compostos e outro após 24h de armazenamento em

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) – Laboratório de Microbiologia - CEP 35.501-296 – Divinópolis – MG

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) – Laboratório de Química Analítica - CEP 35.501-296 – Divinópolis – MG  
Email: camilacassani\_1@yahoo.com.br

refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para avaliar a estabilidade dos compostos.

Primeiramente, foi preparado o inóculo da bactéria *K. pneumoniae*, sendo reativada em Caldo Nutriente por 24h. Posteriormente, foi semeada em estria composta em placa de Petri contendo Ágar Nutriente e incubada por 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ , para isolamento de colônias. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) 20% em concentrações que variaram de  $4000\ \mu\text{g/L}$  a  $6,25\ \mu\text{g/L}$ . Foram retiradas entre 2 a 3 colônias isoladas, transferindo-as para um solução salina 0,85%. A turbidez da solução bacteriana obtida foi ajustada com uma solução padrão de MacFarland 0,5, o que representa aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. Posteriormente, foram retirados  $50\ \mu\text{L}$  da solução salina (equivalente a escala de Mc Farland de 0,5) e 10 mL de caldo Mueller-Hinton foram adicionados, o que equivale a uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/ mL. Em com 96 poços foram utilizados controles positivos (estreptomicina  $75\ \mu\text{g/ml}$ , inóculo e caldo MH), controles negativos (DMSO 20%, inóculo e caldo MH), controles de crescimento (inóculo e caldo MH); controle de esterilidade do caldo (MH); branco da amostra (composto e caldo MH) e amostra (composto, inóculo e caldo MH). Assim, as concentrações finais do composto nos poços variaram de  $400\ \mu\text{g/L}$  a  $0,625\ \mu\text{g/L}$ . As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h e a CIM foi avaliada com base na menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento microbiano (detectada pela falta de turbidez, através de leitura da placa em espectrofotômetro com comprimento de onda de  $490\ \text{nm}$ ).

A CIM do composto frente à *K. pneumoniae* foi determinada estatisticamente através de análise de variância dos valores de absorbância obtidos por espectrofotômetro, apresentados em triplicatas, e posterior teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar a diferença entre as médias dos valores obtidos entre o branco da amostra, amostra, branco do meio e controle de crescimento, através do programa GraphPrisma 5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto pirazol apresentou atividade antimicrobiana frente à *K. pneumoniae* na concentração de  $125\ \mu\text{g/L}$ , sendo que o CIM encontra-se entre as concentrações de  $62,5$  a  $125\ \mu\text{g/L}$  (Figura 1), pois como a diluição dos compostos é seriada, a concentração testada capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano não necessariamente é a concentração mínima inibitória. Dessa forma, o intervalo representa as concentrações mais próximas testadas, uma capaz de inibir totalmente o crescimento, e outra, na sequência da diluição, incapaz de inibir o crescimento total.

Os mesmos resultados foram obtidos pelo composto quando comparados ao primeiro experimento, realizado imediatamente após a diluição dos compostos, com o segundo, realizado após 24h, inferindo a estabilidade dos compostos após diluição em DMSO 20% e armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24h.

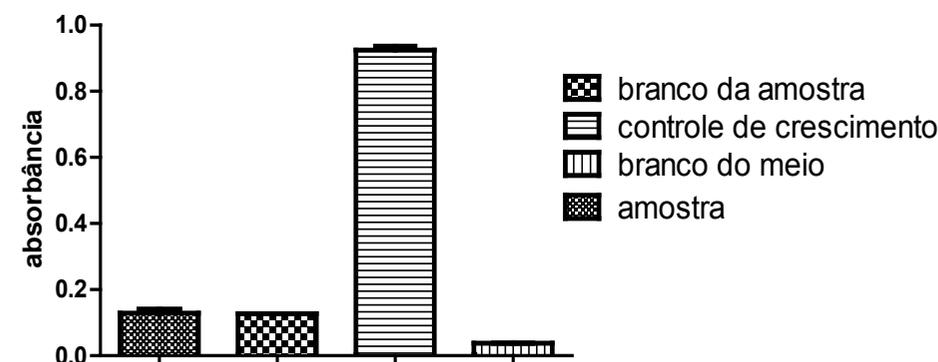


Figura 1. Efeito do composto pirazol na [ $125\ \mu\text{g/mL}$ ] frente à *K. pneumoniae*.

A amostra contém: composto, inóculo e caldo MH; o branco da amostra: composto e caldo MH, controle de crescimento: inóculo e caldo MH; e branco do meio: caldo MH. Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de variância dos valores de absorbância e posterior teste de Tukey, sendo que não houve diferença significativa entre as médias da amostra e branco da amostra ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

Este estudo investigou a potencial ação antimicrobiana *in vitro* do composto sintético pirazol para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas frente à *K. pneumoniae*. Os resultados mostraram que o composto tem ação bacteriostática na concentração de 125 µg/L. Além disso, o trabalho mostra que estes compostos químicos podem ser novas perspectivas para a busca de drogas e que mais estudos devam ser realizados para esclarecer suas ações frente à *K. pneumoniae*.

## REFERÊNCIAS

- 1 PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- 2 MONTGOMERIE, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella* and Hospital-Associated Infections. **Review of Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 736-753, September 1, 1979.
- 3 ORSI, G. B. et al. Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 1, p. 54-58, 2011.
- 4 SHO, T. et al. The Mechanism of High-Level Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Underlying Ompk36-Deficient Strains Represent a Threat of Emerging High-Level Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* with IMP-1 beta-Lactamase Production in Japan. **Microb Drug Resist**, v. 20, p. 20, 2013.
- 5 CUZON, G. et al. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. **Int J Antimicrob Agents**, v. 8, n. 13, p. 00128-3, 2013.
- 6 OZDEMIR, A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazoline Derivatives Bearing an Indole Moiety as New Antimicrobial Agents. **Arch Pharm**, v. 16, n. 10, p. 201200479, 2013.
- 7 PODVINEC, M. et al. Novel inhibitors of dengue virus methyltransferase: discovery by in vitro-driven virtual screening on a desktop computer grid. **J Med Chem**, v. 53, n. 4, p. 1483-95, 2010.
- 8 STEUER, C. et al. Optimization of Assay Conditions for Dengue Virus Protease: Effect of Various Polyols and Nonionic Detergents. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 9, p. 1102-1108, October 1, 2009.