

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FRANCIELA ARENHART SOARES

**AVALIAÇÃO DE TIOCIANATOS ALÍLICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE AOS PATÓGENOS ESKAPE**

Porto Alegre, 2 de Dezembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

FRANCIELA ARENHART SOARES

**AVALIAÇÃO DE TIOCIANATOS ALÍLICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE AOS PATÓGENOS ESKAPE**

Trabalho de conclusão apresentado junto
à atividade de ensino “Trabalho de
Conclusão de Curso - QUI” do Curso de
Química, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Química

Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira
Orientador

Porto Alegre, 2 de Dezembro de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo, Prof. Gustavo pela oportunidade, dedicação e paciência conferidas a mim durante este último ano de graduação. É um grande orgulho poder ser sua aluna. Juntos, fizemos várias conquistas e descobertas em apenas um ano de trabalho e muitas outras certamente estão por vir.

Deixo aqui o meu muito obrigado aos professores do curso de química, Prof. Gregório, Prof. Ricardo Rosa, Prof. José Eduardo, Prof. Aloir, Prof. Fabiano e Profa. Fernanda, muito mais do que professores vocês foram e são meus mestres. Graças a vocês sou fascinada pela química. Gostaria de agradecer aos demais professores com os quais realizei Iniciação Científica, Profa. Sônia, Profa. Rosângela e Prof. Marco Antônio, que de alguma forma contribuíram para minha formação como química.

Agradeço, também, aos meus colegas de laboratório Herbert, Débora, Gisele, Paola, Prof. Dennis, Prof. Eduardo e Carol pelas risadas compartilhadas, quilos adquiridos e principalmente pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Certamente o ambiente de trabalho amigável e descontraído tornou as horas de trabalho mais agradáveis.

Aos meus amigos e irmãos de coração, Ketty, Adri, Artur, Jônatas, Alessandro, Mauro, Alex e Aline, obrigada pela paciência infinita, pelo colo e por todos os momentos compartilhados durante a graduação. Espero compartilhar muitos mais ao longo das nossas vidas.

Aos meus amados e queridos pais, Mauro e Vilci, alicerces da minha vida, muito obrigada por todo apoio, confiança e fé durante esses anos longe do ninho. Às minhas avós, Vó Eva e Vó Tule, que são as mulheres da minha vida. E a meu Deus, pois sem Ele, nada disso seria possível.

“Viver num mundo sem tomar consciência do significado do mundo é como vagar por uma imensa biblioteca sem tocar nos livros”.

(Dan Brown)

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a investigação de uma pequena biblioteca de tiocianatos alílicos frente a bactéria ESKAPE *Staphylococcus aureus* por meio da técnica de micro diluição de caldo em série. Para a realização dos testes também foram utilizados microrganismos gram-positivos (*Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) e um gram-negativo (*Escherichia coli*). Foi testado um conjunto de tiocianatos alílicos aromáticos contendo substituintes Br, Cl, F, NO₂ e OMe em diferentes posições do anel a fim de serem desenvolvidas racionalizações de relações de estrutura e atividade (REA). Este grupo de compostos foi sintetizado por um método simples, em três etapas, com 20-64 % de rendimento global a partir de reagentes comerciais de baixo custo. Os pontos de corte foram determinados utilizando-se antibióticos β-lactâmicos: penicilina-G, oxacilina e ampicilina, os quais são os antibióticos de escolha para o tratamento de doenças causados pelos patógenos e possuem valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os testes foram realizados em triplicatas e apresentada uma média dos resultados. Para as bactérias gram-positivas os tiocianatos alílicos contendo os grupos cloro-fenil e naftil foram os agentes antimicrobianos mais eficientes, apresentando CIM de 16-32 µg/ml. Dos compostos testados, nenhum apresentou atividade inibitória frente a bactéria gram-negativa

Palavras chave: química medicinal, ESKAPE, antimicrobianos, tiocianatos alílicos, microbiologia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Tiocianatos alílicos avaliados neste trabalho.....	11
FIGURA 2 - Bactérias coradas pelo método de Gram.....	13
FIGURA 3 - N-acetilglicosamina (NAG) e Ácido N-acetilmurâmico (NAM).....	13
FIGURA 4 - Algumas famílias de antibióticos.....	17
FIGURA 5 - Método de semeadura por esgotamento.....	22
FIGURA 6 - Crescimento das bactérias em caldo nutritivo BHI.....	22
FIGURA 7 - Antibióticos β -lactâmicos utilizados como ponto de corte.....	24
FIGURA 8 - Placa de Elisa após a incubação.....	26
FIGURA 9 - Esquema da distribuição dos antibióticos para verificação dos pontos de corte.....	28
FIGURA 10 - Análogos do composto naftil-alil 1h	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC.....	American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI.....	Caldo Brain-Heart-Infusion
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
CLSI.....	<i>Clinical and Laboratorial Standards Institute</i>
DABCO.....	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ISDA.....	Sociedade Norte Americana de Doenças Infecciosas
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria Monocytogenes</i>
MBH.....	Morita-Baylis-Hillman
MH.....	Caldo Mueller-Hinton
MRSA.....	<i>S.aureus</i> resistentes a meticilinas
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAG.....	N-acetilglicosamina
NAM.....	ácido N-acetilmurâmico
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
REA.....	Relação Estrutura e Atividade
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SM.....	Meio Skim Milk
UFC.....	Unidades Formadoras de Colônia
UTI.....	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS.....	12
3.2 A PAREDE CELULAR BACTERIANA.....	13
3.3 PATÓGENOS SKAPE.....	14
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	15
3.3.2 <i>Escherichia coli</i>.....	15
3.3.3 <i>Bacillus cereus</i>.....	16
3.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>.....	16
3.4 AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	16
3.5 REAÇÃO DE MORYTA-BAYLIS-HILMANN.....	18
3.6 TIOCIANATOS.....	18
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	20
4.1.1 Meios de cultura.....	20
4.1.2 Obtenção de culturas puras.....	20
4.1.3 Padronização do inoculo para determinação da CIM.....	22
4.1.4 Manutenção e armazenagem das cepas bacterianas.....	23
4.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	24
4.2.1 Soluções estoque dos tiocianatos.....	25
4.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE.....	25
4.3.1 Leitura das placas.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 TREINAMENTO.....	27
5.2 CIM DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	27
5.3 TRIAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS PROTÓTIPOS: OBTENÇÃO DA REA.....	29
5.4 INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE UFC NA CIM.....	34
5.5 DESENVOLVIMENTO DE ANÁLOGOS DOS TIOCIANATOS ALÍLICOS.....	35
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	43
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são microrganismos unicelulares de extrema simplicidade quando comparados à complexidade do ser humano. Ao mesmo tempo em que necessitamos das bactérias para garantir a nossa sobrevivência, travamos uma luta constante contra esses microrganismos. Similarmente, eles também desenvolveram mecanismos que permitem a sua sobrevivência frente às condições adversas impostas pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. Durante décadas, antibióticos foram administrados sem prescrição médica e veterinária para doenças muitas vezes sem relação bacteriana, contribuindo para o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos medicamentos. Tal fenômeno ficou conhecido como resistência microbiana e hoje é uma das maiores preocupações das autoridades da saúde, devido a redução dos agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento de doenças infecciosas.

Foi identificado um grupo de patógenos mais frequentemente resistentes aos antimicrobianos convencionais, intitulado ESKAPE, composto por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter species*.

Muitos pacientes contaminados com patógenos resistentes são infectados dentro das unidades de tratamento intensivo em hospitais, aumentando ainda mais a gravidade do risco que os pacientes são submetidos nesses ambientes. Além disso, esses pacientes são submetidos a tratamentos ainda mais longos, tóxicos e muitas vezes ineficientes devido à escassez de medicamentos que atuem de forma eficaz frente aos microrganismos resistentes.

Devido ao baixo número de novos agentes antimicrobianos eficientes e de baixa toxicidade lançados no mercado nos últimos anos, a busca por novas drogas faz-se necessária. Assim, neste trabalho é apresentada determinação da concentração inibitória mínima de uma biblioteca contendo 15 tiocianatos alílicos frente a patógenos hospitalares e alimentares como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* através de um método simples, rápido, eficaz e de baixo custo a partir da técnica de micro diluição em caldo. Também são apresentadas as relações de estrutura e atividade (REA)

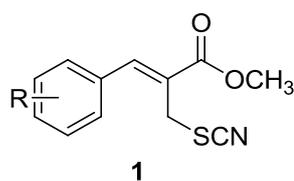
para os compostos avaliados, bem como propostos análogos a serem preparados visando o aumento da atividade biológica.

.

2 OBJETIVOS

Promover a triagem de uma biblioteca de tiocianatos alílicos **1** frente a bactérias Gram-negativos e Gram-positivos para determinação de suas CIM empregando a técnica de micro diluição em caldo (WATTS et al, 2008) utilizando Penicilina-G, oxalilina e ampicilina como antibióticos para determinação dos respectivos pontos de corte.

Figura 1: Tiocianatos alílicos avaliados neste trabalho.



R = Br, Cl, F, OMe, NO₂

Comparar os resultados obtidos com os reportados na literatura para os mesmos compostos, porém avaliados utilizando-se a técnica de difusão em ágar e após a técnica de micro diluição em caldo (SÁ et al, 2013).

Sugerir a preparação racional de análogos visando o aumento da atividade antimicrobiana frente aos patógenos ESKAPE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

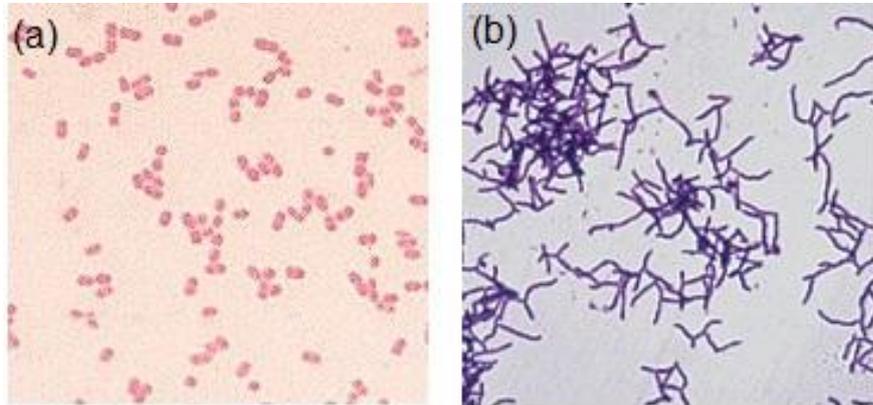
Desde os primórdios da civilização o homem necessitou lutar pela sobrevivência, seja na busca por alimento ou na cura de doenças. Na antiguidade, as doenças infecciosas foram muitas vezes compreendidas erroneamente como desígnios divinos, como foi com caso da peste bubônica. Esta doença, provocada pela bactéria *Yersinia pestis*, dizimou mais de um terço da população europeia no século XIV (WHO, 2013). Nos últimos 70 anos, o desenvolvimento de fármacos, como a Penicilina, permitiu o combate as doenças bacterianas promoveu redução drástica das mortes por doenças infecciosas. No entanto, assim como o homem, as bactérias também desenvolveram mecanismos de defesa. Em 1960 foram identificadas algumas variedades de *Staphylococcus* resistentes contra os agentes microbianos utilizados. Devido a grande velocidade de reprodução das bactérias e com o aumento do fluxo do comércio e viagens, o fenômeno da resistência é espalhado muito rapidamente colocando em alerta a saúde pública (CDC, 2013a) (WHO, 2012).

3.1 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Dentre os vários métodos de classificação existentes para as bactérias, a técnica da coloração de Gram é um método de classificação que permite a categorização simples e rápida das bactérias de acordo com a constituição da parede celular em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000).

Criado em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, a técnica de identificação de Gram consiste na coloração de um esfregaço fixado por calor em uma lâmina de vidro. Inicialmente é aplicado sobre o esfregaço um corante púrpura, normalmente cristal violeta, o qual irá corar todas as células presentes. Após a lavagem do corante púrpura, é aplicada uma solução de lugol contendo iodo. Em seguida a lâmina é lavada com um agente descolorante que irá remover a cor de algumas espécies de bactérias. Finalmente, aplica-se um contracorante, geralmente fucsina, para que as células que foram descoradas possam ser visualizadas ao microscópio. Às bactérias de cor púrpura dá-se a classificação de Gram-positivas e àquelas de cor rosa Gram-negativas (Figura 2).

Figura 2: Bactérias coradas pelo método de Gram. (a) Bactéria Gram-negativa. (b) Bactéria Gram-positiva.

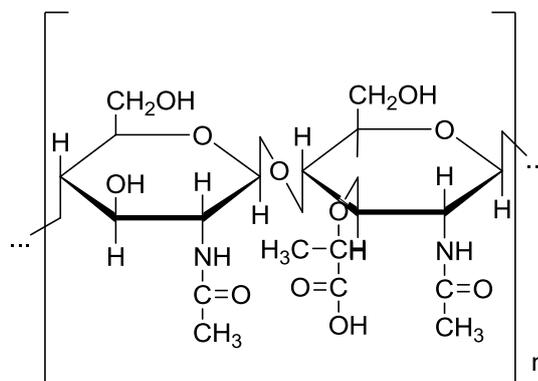


As diferenças estruturais da parede celular das bactérias estão relacionadas com a retenção ou perda da coloração púrpura. As bactérias Gram-positivas possuem parede celular mais espessa de peptidoglicana que as bactérias Gram-negativas.

3.2 A PAREDE CELULAR BACTERIANA

A parede celular bacteriana é constituída de peptidoglicana, uma rede macromolecular que consiste em um polissacarídeo (Figura 3) e polipeptídeos, que conferem forma, proteção e rigidez da célula bacteriana (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). A estrutura dissacarídica é composta por dois monossacarídeos derivados da glicose, ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG).

Figura 3: N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM).



Os sacarídeos NAM e NAG agrupam-se alternadamente em cadeias lineares de 10-65 unidades que dão origem a porção glicana da peptidoglicana. As cadeias são unidas por polipeptídeos, normalmente grupos de quatro amino ácidos, ligados à porção NAM da cadeia de sacarídeos.

A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída de várias camadas de peptidoglicana, formando uma camada espessa e rígida em contraste às bactérias Gram-negativas, as quais possuem apenas uma ou algumas camadas de peptidoglicana, sendo muito mais frágeis quanto ao rompimento celular.

3.3 PATÓGENOS ESKAPE

As autoridades na área da saúde como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Sociedade Norte Americana de Doenças Infecciosas (ISDA) tem alertado a população mundial para o desenvolvimento de cepas de microrganismos resistentes frente aos antimicrobianos utilizados atualmente. O desenvolvimento de resistência dos microrganismos é natural. No entanto, o uso indevido de antibióticos tem acelerado o processo.

Estudos indicam um grupo de patógenos altamente resistentes como os responsáveis pela maioria das mortes por doenças infecciosas. O grupo, conhecido como ESKAPE (PENDLETON, GORMAN, GILMORE, 2013) (RICE, 2010) (BOUCHER et al, 2009), é composto pelas bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter spp*, as quais, como o próprio nome sugere, tem a capacidade de “escapar” aos efeitos dos antimicrobianos conhecidos.

A *National Healthcare Safety Network* estima que mais de 40% das infecções adquiridas em unidades de tratamento intensivo (UTI) envolvam os patógenos ESKAPE (RICE, 2010). Pacientes infectados com microrganismos resistentes são submetidas a tratamentos ainda mais longos e de alto custo, algumas vezes menos eficientes, mais tóxicos e exaustivos. Dessa forma, a busca por novos agentes antimicrobianos com baixa toxicidade e alta eficiência demonstra-se urgente.

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria Gram-positiva e ocorre em grupos que se assemelham a cachos de uva. Devido a cor amarelada das colônias recebeu o nome de *aureus* (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). É comumente encontrado na pele, interior das narinas e axilas sendo um proeminente patógeno causador de infecções em feridas e cortes cirúrgicos por meio da formação de biofilmes (PENDLETON, GORMAN, GILMORE, 2013). As enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus* causam febre alta e vômitos quando ingeridas e são a causa mais comum de intoxicação alimentar.

A identificação das primeiras cepas de *S.aureus* resistentes a meticilinas (MRSA) se deu em 1960. Em 2002, foram confirmadas a existência das primeiras cepas hospitalares resistentes a vancomicina, antibiótico de última escolha para o combate desses microorganismos (SILVEIRA, 2006). Em 2007, estimava-se que aproximadamente todas as infecções hospitalares causadas por *S. aureus* existentes nos Estados Unidos fossem originadas de microorganismos resistentes a penicilina e muitas destas resistentes também a derivados de meticilinas (CDC, 2011) agravando ainda mais a situação. Assim, novas classes de antimicrobianos para o combate a MRSA são necessárias, uma vez que os antimicrobianos empregados atualmente apresentam toxicidade elevada, baixa eficiência e resistência emergente (BOUCHER et al, 2009).

3.3.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, normalmente encontrado no intestino de humanos e animais. As cepas de *E. coli* são, na sua maioria, inofensivas à saúde dos homens. No entanto, algumas cepas são patogênicas, podendo causar diarreia quando ingeridas em alimentos ou água contaminados (CDC, 2013b).

E. coli é a bactéria mais estudada pelo homem, sendo conhecida tanto sua bioquímica quanto seu código genético. Por ser facilmente encontrada e por apresentar reprodução e crescimento rápidos, é normalmente utilizada para estudos *in vitro* em laboratórios (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000).

Em um estudo realizado Tadesse e colaboradores, verificou-se que aproximadamente 54% das cepas de *E. coli* isoladas de homens e animais eram

resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos convencionais. Além disso, foi identificado um número maior de cepas resistentes em animais do que em humanos, como consequência do uso indiscriminado de antibióticos na criação de animais (TADESSE et al, 2012).

3.3.3 *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria Gram-positiva, comum no solo e na vegetação sendo considerada inofensiva. No entanto, a formação endósporos vinculado ao consumo de alimentos mal cozidos está relacionada a infecções intestinais (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000) (PRESCOTT, 2002). Além disso, dependendo da cepa de bactéria, o *B. cereus* pode produzir enterotoxinas que são resistentes ao calor, causando infecções mesmo com o consumo de alimentos adequadamente cozidos.

Devido à produção da enzima β -lactamase a maioria das cepas de *B. cereus* isoladas de alimentos apresenta baixa susceptibilidade antimicrobianos derivados das β -lactamas, como a penicilina e ampicilina. Além desses antimicrobianos, o *B. cereus* apresenta resistência a cefalosporinas (PHAC, 2012).

3.3.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um bacilo Gram-positivo encontrado no solo, vegetais e fezes de animais. É um patógeno intracelular, reproduzindo-se no interior de células fagocíticas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000).

A listeriose é uma doença leve, assintomática em adultos saudáveis. Entretanto, para pacientes imunodeficientes ou gestantes pode apresentar sérias consequências. *L. monocytogenes* tem afinidade especial para o crescimento em células do sistema nervoso central e placenta. O crescimento no SNC é expresso como meningite e no caso do crescimento na placenta em gestantes pode levar a abortos espontâneos ou natimortos.

A *L. monocytogenes* é naturalmente resistente a quinolonas, fosfomicinas e cefalosporinas, mas é altamente sensível aos antibióticos ativos frente a microrganismos Gram-positivos. Além disso, dificilmente essa bactéria adquire resistência aos antimicrobianos empregados, sendo observados casos isolados de

resistência adquirida pela transferência de genes provenientes de outras bactérias (MORVAN et al, 2010).

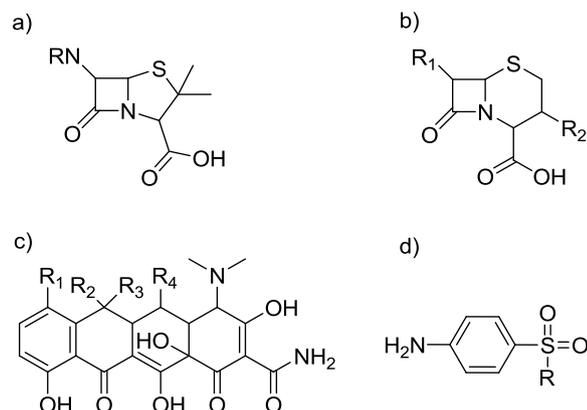
3.4 AGENTES ANTIBACTERIANOS

Os agentes antibacterianos incluem tanto os antibióticos, metabólitos secundários obtidos biologicamente, como as drogas sintéticas obtidas por meio de reações químicas (TALARO, TALARO, 2002). Eles podem ser classificados ainda em dois grupos de acordo com a sua abrangência, amplo- e estreito-espectro, abrangendo um grande e pequeno número de microrganismos, respectivamente.

O modo como essas drogas agem sobre um determinado microrganismo varia de droga para droga, podendo-se destacar cinco mecanismos de ação: inibição do metabolismo celular; inibição da síntese da parede celular bacteriana; interações com a membrana plasmática; interrupção da síntese de proteínas; e inibição do transporte e replicação de ácidos nucleicos (PATRICK, 2009). O estudo detalhado desses mecanismos permitiu uma maior compreensão da estrutura e funções celulares de muito patógenos contribuindo para a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos.

Atualmente, são comercializados cerca de 260 agentes antimicrobianos diferentes, os quais podem ser agrupados em 20 famílias (TALARO, TALARO, 2002) (Figura 4). Uma mesma droga pode ser comercializada sob diferentes nomes, como é o caso da Ampicilina que é vendida sob mais de 50 nomes diferentes, dando a falsa impressão de um número muito maior de drogas disponíveis no mercado.

Figura 4: Algumas famílias de antibióticos: a) Penicilinas. b) cefalosporinas. c) tetraciclinas. d) sulfonamidas.

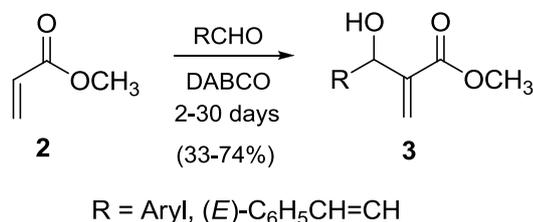


3.5 REAÇÃO DE MORYTA-BAYLIS-HILLMAN

A reação de Moryta-Baylis-Hillman (MBH) consiste em uma ferramenta importante para síntese orgânica, pois permite a construção de ligações carbono-carbono e possibilita a obtenção de estruturas α -metileno- β -hidroxicarbonil a partir da reação de compostos carbonílicos α,β -insaturados e aldeídos, catalisada por aminas terciárias ou fosfinas (WEI, SHI, 2013). A reação catalisada por fosfinas foi primeiramente reportada por Morita em 1968 e, em 1972, Baylis e Hillman reportaram uma reação semelhante, mas catalisada por aminas. No entanto, somente a partir da década de 80 a reação passou a ser novamente estudada e na década de 90 seu emprego apresentou crescimento exponencial.

Os adutos MBH **3** foram obtidos por meio da reação de aldeídos aromáticos e o éster α,β -insaturado acrilato de metila **2** catalisada pela amina 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO). A reação apresenta rendimentos de 33 a 74% partindo-se de aldeídos aromáticos e (*E*)-estirilaldeído (Figura 5).

Esquema 1: Obtenção dos adutos MBH **3**.



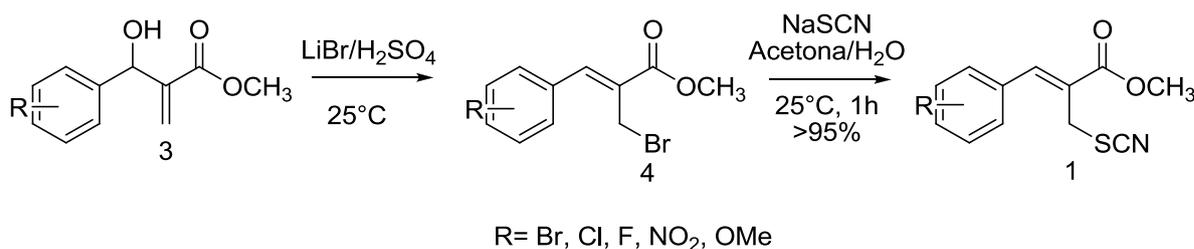
3.6 TIOCIANATOS

Compostos orgânicos contendo o núcleo S-C-N como tiouréias, isotiouréias e sais de isotiurônio são reconhecidamente interessantes por apresentarem atividade biológica (ALLAN et al, 1986). Porém, poucos exemplos de compostos contendo tiocianatos haviam sido reportados apresentando atividade biológica. Contudo, recentemente, Silveira e colaboradores (SILVEIRA et al, 2012) apresentaram a preparação de uma biblioteca de tiocianatos alílicos com atividade inibitória frente a micobactéria causadora da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (*MtB*), na ordem de nanomolar.

Tiocianatos alílicos são facilmente obtidos, em altos rendimentos, em três etapas sintéticas. Assim, os adutos MBH **3** são tratados com uma mistura de brometo de lítio e ácido sulfúrico (LiBr/H₂SO₄) em acetonitrila, a temperatura ambiente, para a obtenção de brometos alílicos **4** em 75-95% de rendimento. Subsequente substituição nucleofílica S_N2 do respectivos brometos **4** por SCN⁻ em meio aquoso gera os tiocianatos alílicos **1** em excelentes rendimentos (SILVEIRA et al, 2012) (Esquema 2).

Portanto, a preparação de tiocianatos alílicos em escala de centenas de gramas a dezenas de quilos podem ser realizadas sem grandes dificuldades. Assim, a síntese de compostos contendo essa funcionalidade, bem como a triagem dessas substâncias frente a microorganismos, é de grande apelo.

Esquema 2: Síntese dos tiocianatos alílicos **1**.



4 METODOLOGIA

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de agente microbiano que previne o crescimento visível de um microrganismo em ágar ou em teste de suscetibilidade, como o método de micro diluição em caldo, após um tempo ótimo de incubação (WATTS et al, 2008) (HANNAN, 2000). Seguindo os procedimentos padrões para obtenção da CIM frente a micoplasmas veterinários (HANNAN, 2000), foi feita a identificação de *hits* frente a bactérias ESKAPE (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) através da técnica de micro diluição em caldo em série. Todos os procedimentos descritos foram realizados sob chama a fim de evitar a contaminação com microrganismos presentes no ar. Todos os resíduos foram autoclavados para descontaminação completa e encaminhados para descarte.

4.1.1 Meios de Cultura

O meio de cultura é o material nutriente para crescimento dos microrganismos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). Foram utilizados como meio de cultura ágar, caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e caldo Mueller-Hinton (MH), HIMEDIA. Para a preparação dos caldos BHI e MH, os sólidos foram dissolvidos em água deionizada a 90 °C e autoclavados a 121 °C durante 30 minutos em autoclave AB12 *Phoenix*.

Para preparação das placas de Petri contendo ágar e caldo, foram utilizadas placas de Petri com área de crescimento de 60,1 cm², TPP - modelo 93100 e estéreis. As soluções de ágar contendo BHI como meio nutritivo foram preparadas de modo análogo aos caldos. Os sólidos foram dissolvidos em água deionizada a 90 °C. A solução foi autoclavada durante 30 minutos a 121 °C e vertida sobre as placas. Após a gelificação do ágar, as placas foram incubadas a 36 ± 1°C em estufa incubadora COEL TLK48 de Leo, durante 24 horas.

4.1.2 Obtenção de Culturas Puras

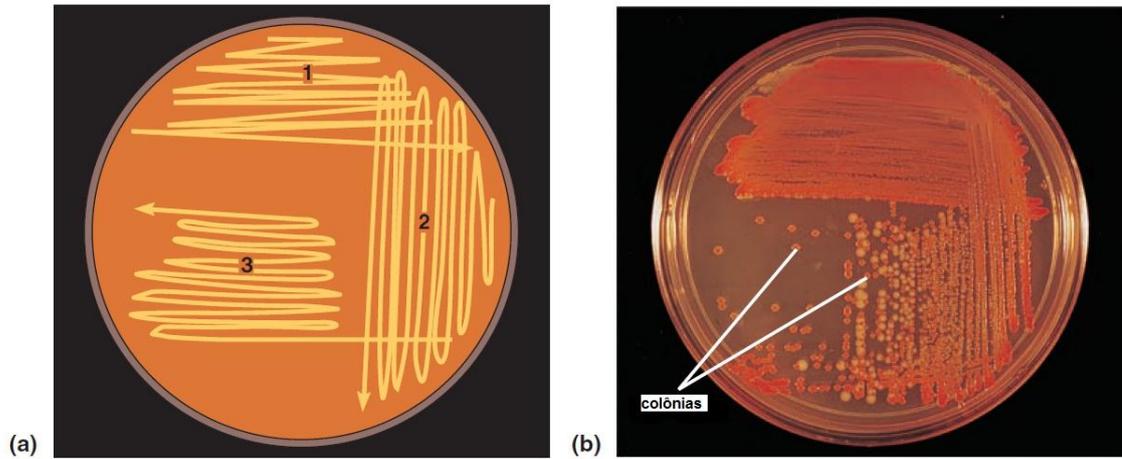
A fim de garantir a reprodutibilidade e a acuidade dos resultados, a pureza e a identificação dos microrganismos utilizados nos testes foram previamente confirmadas. Para isso, foram realizados testes de coloração de Gram com cada uma das cepas de bactérias utilizadas neste trabalho.

Neste trabalho foram utilizadas cepas de bactérias provenientes de coleções de referência como as fornecidas pela *American Type Culture Collection* - ATCC (*S. aureus* e *E. coli*) e cepas de bactérias isoladas de alimentos (*B. cereus* e *L. monocytogenes*). Contudo, para todas as cepas foi realizado o processo de isolamento de culturas puras a fim de garantir a natureza do microrganismo utilizado nos testes.

Para a identificação das bactérias por meio da coloração de Gram, foi utilizada a metodologia padrão da técnica (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). Neste procedimento, um esfregaço, isto é, uma ponta de espátula de colônia da bactéria de interesse foi fixado pelo calor em uma lâmina de vidro estéril. O esfregaço foi tingido com cristal violeta durante um minuto e em seguida lavado com água destilada. Após, o esfregaço foi recoberto com lugol durante mais um minuto e em seguida lavado com uma solução de álcool-acetona. Por fim, foi adicionado o corante fucsina, o qual foi lavado 30 segundos após ser aplicado sobre o esfregaço. A lâmina foi seca com papel filtro e examinada em microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

Para a obtenção de culturas puras, foi utilizado o método de semeadura por esgotamento (TALARO, TALARO, 2002) que consiste em inocular uma placa de Petri contendo meio nutritivo BHI utilizando alça de inoculação estéril com cerca de 1 mg de microrganismo. A bactéria foi então semeada sobre a superfície do meio nutriente sólido (Figura 5). No final da semeadura, devem restar poucas células bacterianas sobre a alça e que quando semeadas darão origem a colônias isoladas. A separação efetiva foi observada pela formação de colônias puras isoladas que foram identificadas por sua cor e forma. Após a semeadura, as placas inoculadas foram incubadas em estufa durante 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 5: Método de semeadura por esgotamento: a) direções de semeadura. e b) colônias isoladas após incubação.



Adaptado de (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000).

4.1.3 Padronização do inoculo para determinação da MIC

O método de semeadura por esgotamento garante a obtenção de colônias isoladas puras. Após a obtenção das colônias, uma única colônia foi transferida para um tubo de ensaio estéril contendo de 2 a 3 ml de BHI, que foi então incubado em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ de 3 a 4 horas sob agitação em agitador rotativo da TECNAL, modelo TE-165.

Figura 6: Crescimento das bactérias em caldo nutritivo BHI.



Esquerda, tubo contendo caldo nutritivo BHI antes do crescimento do microrganismo. Direita, tubo após crescimento do microrganismo.

Após o crescimento das bactérias em caldo, foi feita uma mensuração do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em solução. O número recomendado de indivíduos (HANNAN, 2000) é 10^3 a 10^5 UFC/mL. O uso de inóculo fora desta faixa pode acarretar em valores de CIM abaixo ou acima do esperado.

A determinação do número de indivíduos foi realizada por densidade óptica e para isso foi utilizado o colorímetro Denville CO7500 *Colorwave*. O comprimento de onda utilizado para as leituras foi de 680 nm, as cubetas de acrílico são descartáveis e possuem caminho óptico de 1 cm. Neste procedimento, 2 ml de MH foram adicionados à cubeta e foi medida a absorvância. Este valor é utilizado como referência. Em seguida, cerca de 200 μ L de inóculo foram adicionados e medida a absorvância da solução contendo inóculo. A absorvância deve situar-se numa faixa de 0,08 a 0,13 para que se tenha em solução cerca de 10^3 a 10^5 UFC/mL.

4.1.4 **Manutenção e armazenagem das cepas bacterianas**

A armazenagem e replicação das cepas bacterianas são realizadas segundo as recomendações apresentadas pelo CLSI (WILKER et al, 2006). Para o armazenamento prolongado das cepas bacterianas é utilizado o meio nutritivo *Skim Milk* (SM) ou simplesmente leite em pó desnatado. Este meio permite a armazenagem de bactérias a temperaturas inferiores a -60°C por longos períodos.

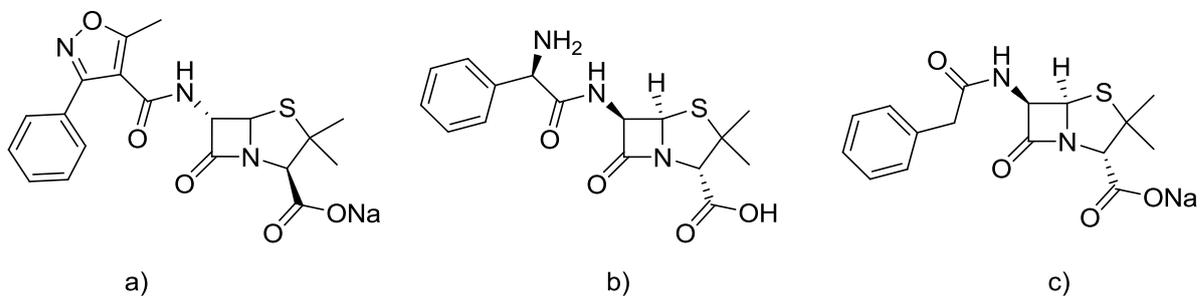
Os microrganismos utilizados durante os testes são crescidos e armazenados em placas de Petri contendo meio nutritivo BHI. As cepas foram replicadas semanalmente e descartadas após 3 semanas de armazenamento à temperatura de 1°C .

Novas cepas de trabalho foram preparadas a partir das cepas congeladas em SM. Um pouco da solução de SM contendo a bactéria desejada foi transferida para um tubo de ensaio estéril contendo 2 a 3 mL de BHI, que então foi incubado em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas em *agitador rotativo*. Decorrido o tempo de incubação, uma alça de inoculação estéril foi utilizada para semear a nova cultura na placa de Petri seguindo as direções de semeadura (Figura 5), sendo incubada por mais 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos utilizados neste trabalho foram obtidos e armazenados conforme recomendações do CLSI (WILKER et al, 2006) (WATTS et al, 2008). Para determinação dos pontos de corte foram utilizados os antibióticos de escolha β -lactâmicos penicilina G, ampicilina e oxacilina, os quais possuem CIM conhecida frente aos patógenos utilizados (Figura 7). Todos antibióticos utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma Aldrich, com pureza superior a 95%.

Figura 7: Antibióticos β -lactâmicos utilizados como ponto de corte.



a) Oxacilina, b) Ampicilina e c) Penicilina G.

As soluções de estoque dos antibióticos foram preparadas de termos da base ativa de cada composto (WATTS et al, 2008) (HANNAN, 2000). Isto é, alguns sais diferem consideravelmente na massa molar quando comparados ao composto na sua forma ácida. Assim, é utilizado um fator de correção considerando-se a massa molar e a massa molar da sua base ativa, conforme a equação (1),

$$\frac{M \text{ base}}{M \text{ sal}} \times p = mb. a. \quad (1)$$

onde:

M base: massa molar do composto na forma básica;

M sal: massa molar do composto na forma de sal;

P: grau de pureza do composto;

mb.a.: massa de base ativa do composto.

As soluções estoque de penicilina G, oxacilina e ampicilina foram preparadas em tubos de ensaio estéreis, utilizando caldo MH e homogeneizadas em vortex.

Iniciou-se em 4096 µg/ml de penicilina G e oxacilina, e 32 µg/ml de ampicilina. Assim, obtém-se concentrações iniciais nas placas de 2048 e 16 µg/ml, respectivamente. Essas soluções podem ser congeladas a – 5 °C e reutilizadas por uma vez após retornar à temperatura ambiente.

4.2.1 Soluções de estoque dos tiociantos

Foram preparadas soluções estoque contendo 5 mg/mL de cada tiocianato alílico

1. Desta forma, 1 a 2 mg de cada amostra foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter-se a concentração final desejada. As mesmas soluções estoque foram utilizadas em todos os experimentos não sendo observadas variações dos resultados de CIM fora do reportado pelo CLSI (WATTS et al, 2008).

4.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

Para a realização dos testes de susceptibilidade e obtenção da CIM foi utilizada a técnica da micro diluição seriada em caldo. Nesta técnica são utilizadas placas de Elisa contendo 96 (12 colunas x 8 linhas) poços em forma de “U” com 0,1 ml de meio nutritivo MH em cada poço.

Na primeira linha de cada placa (linha A) foram adicionados 5 µL da solução estoque dos compostos a serem analisados, um por poço, e 100 µL dos antibióticos de referência nos poços de controle. Aos poços contendo os compostos a serem analisados foram adicionados mais 95 µL de caldo MH. Foi adicionado 50 µL de caldo MH aos poços 1-12 de B a H. Em seguida foram retirados 50 µL da linha A e passado para a linha B utilizando pipeta multi-canal 12 vias GOPET II. Misturou-se 3 vezes e passou-se para a linha seguinte, repetiu-se o mesmo procedimento até a linha H. Os últimos 50 µL foram descartados. Finalmente, foram adicionados 50 µL de caldo MH contendo bactéria a todos os poços da placa e a placa foi incubada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas.

4.3.1 Leitura das placas

Após 16 a 20 horas de incubação, procede-se a leitura das placas com determinação da CIM para cada composto pela observação da não-turbidez da solução (Figura 8).

Figura 8: Placa de Elisa após a incubação.



Placa de Elisa após 18 horas de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. As soluções límpidas indicam a inibição do crescimento bacteriano pelos compostos analisados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TREINAMENTO

Inicialmente, com o intuito de aprender o manuseio de pipetadores automáticos e do pipetador multicanal, foi realizado um treinamento com água durante cerca de duas semanas. Neste treinamento buscou-se aperfeiçoar a pipetagem, o preenchimento dos poços e as diluições em série, visto que programas de graduação em Química não costumam utilizar esses equipamentos na formação de Químicos.

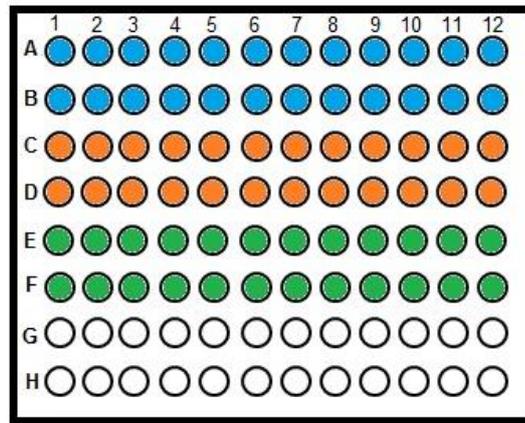
Em seguida, treinou-se o processo de pipetagem utilizando-se bico de Bunsen desligado para simular a área de trabalho de aproximadamente 20 a 30 centímetros de diâmetro ao redor da chama.

5.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Na sequência, promoveu-se a triagem utilizando-se antibióticos β -lactâmicos: penicilina G, ampicilina e oxacilina. Estes agentes antimicrobianos possuem concentração inibitória mínima continuamente avaliada frente a inúmeros microorganismos patogênicos (WATTS et al, 2008). Este procedimento foi realizado com o intuito de comparar os resultados obtidos nos ensaios preliminares de treinamento com os resultados reportados pelo CLSI.

Assim, foram primeiramente avaliadas penicilina G e ampicilina frente a *E. coli*. Os testes foram realizados na sistemática de duas, três e quatro linhas para cada antibiótico com as placas de Elisa na horizontal (Figura 9). Em seguida, estendeu-se o método empregando-se os dois antibióticos anteriores juntamente com oxacilina frente a *E coli* e, posteriormente, *S. aureus*. Todas as triagens foram realizadas em triplicata sendo que os resultados correspondem a média das CIMs obtidas (Tabela 1).

Figura 9: Esquema da distribuição dos antibióticos para verificação dos pontos de corte.



Poços azul (penicilina G), laranja (ampicilina) e verde (oxacilina) e branco sem antibiótico.

Tabela 1: Resultados dos testes para verificação dos pontos de corte dos antibióticos β -lactâmicos.

Composto	Estrutura	CIM		CIM	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	reportada na literatura* <i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	reportada na literatura* <i>S. aureus</i> ATCC 29213
Ampicilina		2	2-8	0,25	0,5–2
Oxacilina		64	NR	<16	0,12–0,5
Penicilina G		16	NR	NA	0,25–2

* Watts *et al*, 2008. CIM em $\mu\text{g/ml}$. NR: não reportado. NA: não avaliado.

A leitura das CIMs foi realizada por meio da observação de precipitados nos poços das placas ELISA. A presença destes indica o crescimento bacteriano. Os resultados de CIM frente a *E. coli* (2 $\mu\text{g/mL}$ vs 2-8 $\mu\text{g/mL}$) e *S. aureus* (0,25 $\mu\text{g/mL}$ vs 0,5–2 $\mu\text{g/mL}$) obtidos para a ampicilina no treinamento preliminar corroboram com o

reportado para o antibiótico de escolha ampicilina frente a esses microorganismos. A diferença de uma unidade de diluição observada para cepa *S. aureus* ATCC 25923 vs ATCC 29213 pode ser explicada por modificações genéticas esperadas que lentamente levam a resistência bacteriana frente ao antibiótico de escolha. Portanto, a avaliação contínua de cepas microbianas hospitalares é de suma importância sendo este procedimento realizado anualmente pelo CLSI.

Infelizmente, não foi possível realizar comparação semelhante para cepas de *E. coli*, pois os dados de CIMs frente a este microorganismo não foram reportadas para penicilina G e oxacilina, uma vez que penicilina G e oxacilina não são ativas frente a bactérias Gram-negativas.

Para a oxacilina, as CIMs reportadas pelo CLSI encontram-se na faixa de 0,12-05 µg/ml. Contudo, como a concentração inicial utilizada nos experimentos foi de 2048 µg/ml, não foi possível obter diluições inferiores a 16 µg/ml. Porém, observou-se a reprodutibilidade nos resultados (sempre inferiores a 16 µg/ml). Entretanto, experimentos estão sendo realizados para comparação com as CIMs reportadas pelo CLSI utilizando-se esse antibiótico frente ao crescimento de *S. aureus*.

Portanto, a consistência e reprodutibilidade dos resultados de CIMs obtidos nesses treinamentos preliminares encorajou-nos a promover a triagem de uma pequena biblioteca de tiocianatos alílicos para rápida identificação de suas CIMs frente a uma série de bactérias Gram-positivas e gram-negativa.

5.3 TRIAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS PROTÓTIPOS: OBTENÇÃO DA REA

Recentemente, Silveira e colaboradores (SILVEIRA et al, 2012) demonstraram a funcionalidade de uma biblioteca de tiocianatos alílicos frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*MtB*). Nesse estudo foi evidenciado que tiocianatos funcionalizados com substituintes fracamente doadores e derivados mono e di-halogenados apresentaram inibição do crescimento da *MtB* em concentrações inibitórias mínimas (CIM) na faixa de nanomolar. Posteriormente, Sá e colaboradores estenderam esse estudo para a identificação da atividade antimicrobiana dos

tiocianatos **1** frente a fungos e bactérias Gram-positivas como *S. aureus* resistente a metilcilina (MRSA), microrganismo pertencente ao grupo ESKAPE (SÁ et al, 2013 – artigo aceito para publicação). Porém, o método da difusão em ágar utilizado por Sá e colaboradores é bastante oneroso do ponto de vista de material e tempo de trabalho empregado para a obtenção dos resultados. Métodos de difusão em ágar são baseados somente na presença ou ausência da área de inibição do crescimento bacteriano. Estes não informam sobre a susceptibilidade do microrganismo frente aos antimicrobianos estudados sendo necessários outros experimentos para a determinação das CIMs (WATTS et al, 2008).

Já a técnica de micro diluição em caldo é um método de susceptibilidade que permite a avaliação de um grande número compostos de forma rápida e barata comumente utilizada por microbiologistas, de forma automatizada na indústria de fármacos e com obtenção direta da CIM. Por meio desta técnica é possível testar o mesmo composto em várias diluições diferentes, economizando amostra e reagentes utilizados e sem a necessidade de grande espaço físico.

O estudo das relações de estrutura e atividade para um grupo de moléculas (REA) tem o objetivo de identificar quais partes da molécula são fundamentais para atividade biológica e como essas partes interagem com um alvo ou possível alvo (PATRICK, 2009). Essa análise pode ser feita por dois caminhos distintos: por meio do conhecimento do alvo - como sítios ativos de uma proteína; ou sem o conhecimento do alvo - como triagens em células inteiras. Neste trabalho buscou-se a compreensão das CIM observadas relacionando-se os grupos funcionais presentes em **1** com a célula inteira.

Portanto, foi avaliada uma biblioteca de tiocianatos alílicos previamente sintetizados (SILVEIRA et al, 2012) frente aos microrganismos *S. aureus* (Gram-positivo) e *E. coli* (Gram-negativo). Para evitar eventuais dúvidas quanto à contaminação com outros microrganismos e garantir a reprodutibilidade dos resultados, as triagens foram realizadas em triplicatas e calculados os valores médios de CIM para cada molécula (Tabela 2).

Para bactérias Gram-positivas, observa-se atividade antimicrobiana moderada 16-64 µg/ml para os tiocianatos alílicos halogenados onde destaca-se o derivado

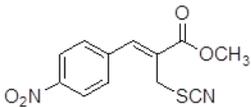
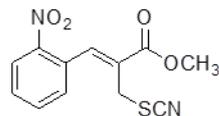
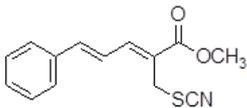
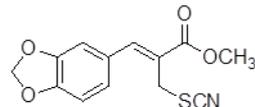
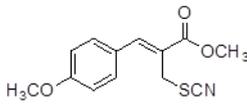
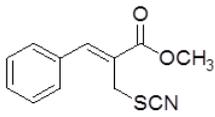
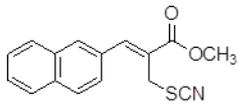
2,4-diclorofenil-alil-tiocianato **1l** como o mais promissor da série (16 µg/mL). A modificação dos haletos (bromo e cloro) por fluor na posição 4 do anel aromático levou a uma drástica redução na atividade antimicrobiana (4-fluorfenil-alil **1o**, 128 - >128 µg/mL) frente a essas bactérias. É sabido que fluor e hidrogênio possuem volumes semelhantes, apesar de suas eletronegatividades e valências serem completamente diferentes. Assim, esses dois substituintes não são considerados isósteros (mesmo número de elétrons de valência), mas sim bioisósteros devido a similaridade de tamanho. De modo interessante, observa-se que ao modificar-se o substituinte fluor pelo seu bioisótero hidrogênio não altera o perfil de atividade (fenil-alil **1g**, 128 µg/mL) o que leva a crer que efeitos de eletronegatividade não são importantes na posição 4 do anel aromático, mas sim efeitos de tamanho do substituinte. Esta suposição também corrobora com o fato da atividade estar aumentando no sentido do aumento do volume do haleto presente na posição 4- (4-clorofenil **1j**, 32-64 µg/mL e 4-bromofenil 32-32 µg/mL). E ainda, nenhum efeito é observado pela presença do grupo 4-metil-fenil **1i** em termos de atividade. Porém, quando o grupo neutro 4-metil-fenil é modificado pelo grupo mais volumoso, naftil, percebe-se um aumento de pelo menos 4 unidades de diluição na CIM (naftil **1h**, 16 - 32 µg/mL). Por sua vez, a homologação da cadeia olefínica representada pelo grupo estiril no derivado **1c** levou a um resultado inusitado visto que a atividade observada é específica para *B. cereus* levando a crer que efeitos conformacionais nesta região da droga possam ser importantes num possível alvo em *S.aureus* (estiril **1c**, 32 µg/mL vs > 128 µg/mL, respectivamente).

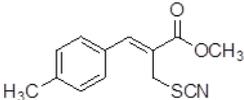
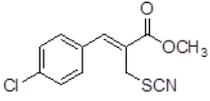
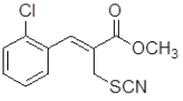
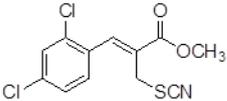
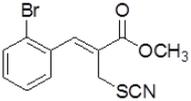
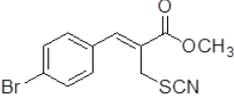
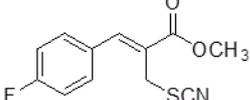
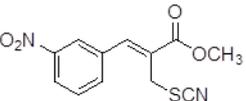
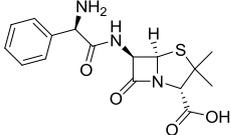
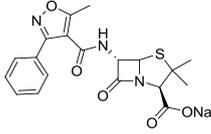
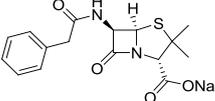
Finalmente, a presença de grupos fortemente doadores de elétrons no anel aromático é deletérea para a atividade biológica como o piperonil derivado **1d** que não apresentou inibição do crescimento da bactéria nas concentrações testadas (efeito bacteriostático). Por sua vez, grupos fortemente retiradores como nitro derivados 4-nitrofenil **1a** e 2-nitrofenil **1b**, apesar de volumosos, também não parecem ser importantes para o aumento da atividade bacteriostática sendo que o melhor resultado obtido foi de 64 µg/mL frente a *S. aureus* para **1a**.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sá e colaboradores (SÁ et al, 2013), onde os derivados halogenados foram avaliados frente a MRSA e *S. aureus* sensível a meticilinas (MSSA) pelo método de teste de difusão em ágar e em seguida pelo método de micro diluição em caldo. Contudo, os valores de CIM

apresentados por Sá e colaboradores, cerca de 0,72 µg/ml para o derivado 2,4-cloro **1l**, são inferiores aos encontrados nas triagens realizadas neste estudo. A comparação entre os métodos é complexa de ser realizada, pois os antibióticos de controle utilizados por eles (imipinen e itraconazol) não são os antibióticos de escolha para os microrganismos testados (MEDSCAPE, 2013) (PATRICK, 2009). E ainda, não são encontradas avaliações reportados pelo CLSI de 2008 frente aos microrganismos *S. aureus* e *B. cereus* que possibilitariam comparações seguras.

Tabela 2: CIM* dos tiocianatos alílicos frente a bactérias Gram-positivas e negativas e pontos de corte dos antibióticos utilizados como agentes de controle.

Composto	Estrutura	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i>
1a		>128	64	128
1b		>128	128	128
1c		>128	> 128	32
1d		>128	> 128	> 128
1e		>128	> 128	> 128
1g		>128	128	128
1h		>128	32	16

1i		>128	128	128
1j		>128	32	64
1k		>128	32	32
1l		>128	16	16
1m		>128	64	32
1n		>128	32	32
1o		>128	128	> 128
1x		>128	128	64
Ampicilina		2	<0,125	> 16
Oxacilina		64	<16	< 16
Penicilina G		16	0,25	NA

*Valores de CIM em $\mu\text{g/mL}$. As triagens foram realizados em triplicata, sendo apresentados os valores médios entre os testes. NA = não avaliado.

Devido aos resultados obtidos frente às cepas de *S. aureus*, buscou-se realizar a avaliação da atividade antimicrobiana dos tiocianatos alílicos frente a outras bactérias Gram-positivas. Havendo a disponibilidade de duas cepas de microrganismos contaminantes de alimentos optou-se pela extensão da metodologia e triagem dos compostos **1** frente a estas cepas. A obtenção dos resultados complementares foi realizada utilizando os microrganismos *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

Para o *B. cereus* foram observados valores de CIM muito semelhantes ao encontrados para *S. aureus*, conforme também apresentado por Sá e colaboradores (SÁ et al, 2013) o que demonstra a acuidade dos resultados obtidos neste estudo. Já no caso da bactéria Gram-positiva *L. monocytogenes* não foi possível observar a formação de precipitados (turbidez) nas placas de Elisa para todos os compostos avaliados, inclusive para os antibióticos de controle. Tal fato pode estar relacionado ao tamanho das colônias formadas por este microrganismo serem muito inferiores aos demais, dificultando a observação de precipitados a olho nu (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). Além disso, pouco se sabe sobre o comportamento desse microrganismo em testes de susceptibilidade uma vez que existe uma carência de informações e métodos padronizados pelo CLSI (JORGENSEN, HINDLER, 2007).

Devido aos resultados promissores obtidos para as micobactérias por Silveira e colaboradores (SILVEIRA et al, 2012) e pelo fato desses microrganismos serem estruturalmente semelhantes às bactérias Gram-negativas quanto a constituição da parede celular, acreditava-se que a triagem de **1** frente a microrganismo Gram-negativos fosse interessante. No entanto, foi observado que nenhum dos compostos promoveu a inibição do crescimento da *E.coli* abaixo da CIM inicial de 128 µg/ml. Esses resultados sugerem a ação seletiva de **1** contra microrganismos Gram-positivos em preferência do que microrganismos Gram-negativos.

5.4 INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE UFC NA CIM

É importante destacar o controle de número de microrganismos em solução entre 10^3 a 10^5 UFC/mL para a reprodutibilidade dos valores de CIM, não devendo ultrapassar o período de 3 a 4 horas de incubação. Tempos superiores de incubação geram valores superiores a 10^5 UFC/mL e que, por sua vez, podem resultar em

valores elevados de CIM. Por outro lado, tempos de incubação menores de 3 horas levam a valores inferiores a 10^3 UFC/mL podendo resultar em uma diminuição da CIM (HANNAN, 2000). Além disso, a utilização de microrganismos com 3 a 4 horas de incubação garante que as culturas sejam sempre avaliadas na fase logarítmica de crescimento para a maioria dos microrganismos, ou seja, durante o seu período de maior replicação de células garantindo maior linearidade dos resultados obtidos.

A metodologia utilizada por Sá e colaboradores prevê a incubação do inóculo somente por duas horas (MANN, MARKHAN, 1998), período inferior ao recomendado atualmente pelo CLSI (WATTS et al, 2008). Visto que os microrganismos encontram-se em diferentes estágios de crescimento, podem ocorrer variações da CIM para um mesmo composto, podendo resultar em valores inferiores de CIM como neste caso.

5.5 DESENVOLVIMENTO DE ANÁLOGOS DOS TIOCIANATOS ALÍLICOS

A proposição de análogos tem como objetivo maximizar as interações do farmacóforo com a célula, promovendo aumento da atividade e seletividade. Buscou-se a proposição de novas estruturas sem o aumento significativo do número de etapas envolvidas na síntese dos compostos.

As modificações sugeridas foram realizadas embasadas em conceitos importantes da química medicinal, como a identificação do farmacóforo e o uso de isósteros. Farmacóforo é a uma estrutura mínima com grupos funcionais específicos de uma molécula que são responsáveis pelas interações da molécula com seu receptor e por consequência da atividade (SILVERMAN, 2004). Já os isósteros são átomos ou grupos de átomos os quais possuem o mesmo número de elétrons de valência, e que possuem semelhanças físicas e químicas (THOMAS, 2007). Um exemplo é o grupo metila (CH_3) o qual possui sete elétrons de valência podendo ser uma hidroxila (OH) a qual também possui sete elétrons de valência. Esse tipo de modificação estrutural é normalmente utilizada para verificar a importância de determinados grupos na molécula que estejam relacionados à sua atividade biológica.

Tiocianatos alílicos **1** são facilmente obtidos em sínteses bastante curtas do ponto de vista do número de etapas envolvido. Além disso, análogos podem ser facilmente obtidos modificando-se o aldeído de escolha para síntese dos adutos MBH. Para isso foi verificada a disponibilidade comercial de cada um dos aldeídos sugeridos para a construção dos análogos. As estruturas dos novos derivados dos tiocianatos alílicos, bem como o aldeído de partida podem ser observados na Tabela 3.

Esquema 3: Rota sintética para obtenção dos análogos.

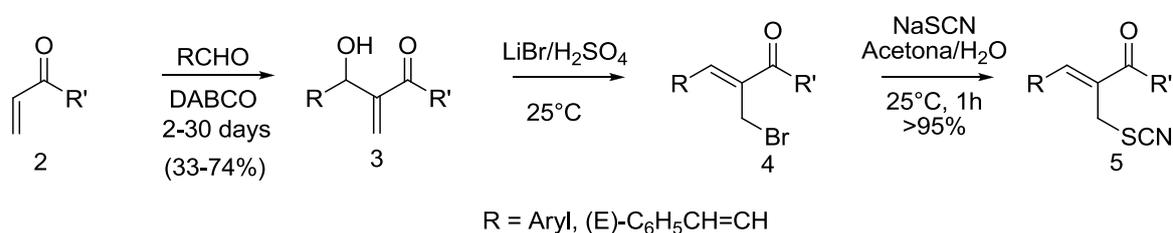
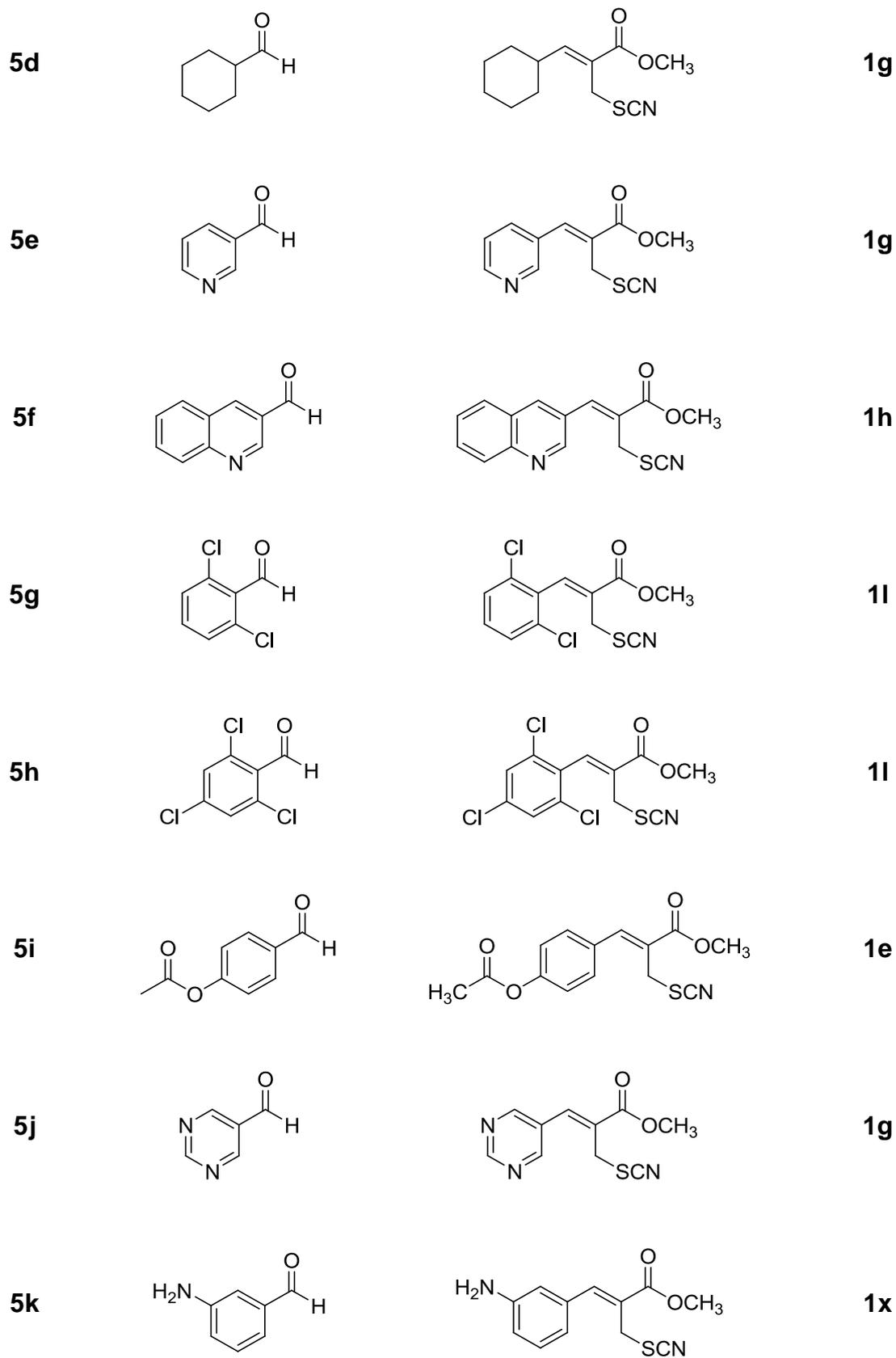
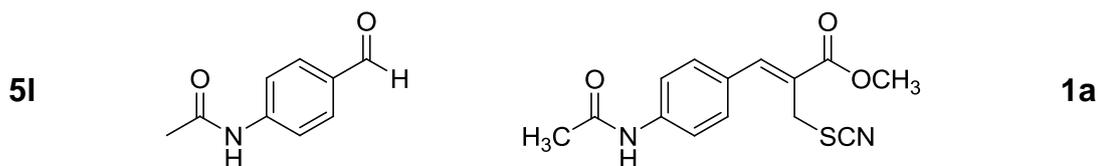


Tabela 3: Novas gerações de tiocianatos alílicos: modificações no aldeído de partida

Entrada	Aldeído de Partida	Análogo	Estrutura (Tabela 2)
5a			1a
5b			1b
5c			1e





Com o intuito de verificar a presença de interações hidrofóbicas entre o anel aromático e o substrato e efeitos estéricos, optou-se pela construção de um derivado do ciclohexanocarbaldeído **5d**. O radical fenila tem estrutura planar e normalmente relaciona-se com o alvo por meio de interações de van der Waals, enquanto seu parente próximo, ciclohexanila apresenta-se em uma conformação compacta. Essa característica do radical ciclohexanila faz com que as interações hidrofóbicas sejam menos efetivas devido a menor área superficial apresentada por este radical (THOMAS, 2007). Além disso, a proposição do composto **5d** visa à confirmação da estrutura proposta para o farmacóforo.

Diante do fato que não foi observada atividade frente à bactéria Gram-negativa e conhecendo as algumas das características da membrana celular desses microrganismos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000) (PRESCOTT, 2002) (PRESCOTT, 2002) propôs-se a inserção de grupos hidrofílicos como derivados de anilinas (**5a**, **5b**, **5k**) e fenóis (**5c**). Além disso, a inserção desses grupos funcionais no anel aromático faz com que sejam possíveis interações de hidrogênio entre a droga e um possível alvo. A presença da função éter em **1e** inibe este tipo de interações intermoleculares, pois a presença da metila causa bloqueio estérico durante a aproximação da molécula com seu alvo. Já a presença de grupos nitro (NO_2) em **1a**, **1b** e **1x**, além de impedir as ligações de hidrogênio, contribui para o aumento da toxicidade do composto. Além disso, as aminas desempenham um papel biológico importante, estando presentes em diversas drogas comercializadas e em inúmeros produtos naturais (PATRICK, 2009) podendo atuar tanto como doadores quanto aceptores de ligações de hidrogênio em um possível alvo na célula bacteriana.

Por outro lado, é importante ressaltar que os substituintes $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$ são doadores de elétrons por efeito de ressonância, aumentando a densidade eletrônica sobre o anel aromático (MCMURRY, 2009). Este fato pode implicar em perda de

atividade para microrganismos Gram-positivos, visto que os melhores resultados foram expressos pelos compostos contendo grupos hidrofóbicos ligados ao anel **1j-l**.

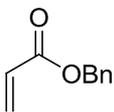
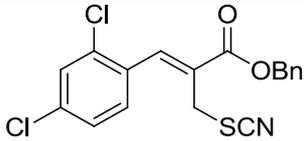
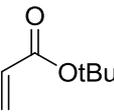
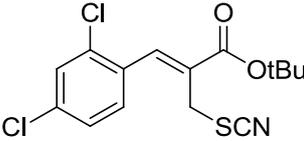
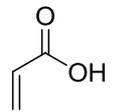
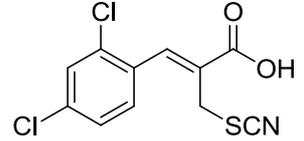
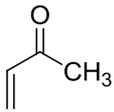
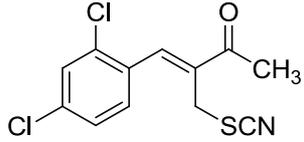
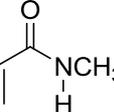
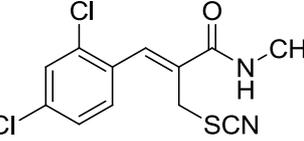
Devido à ocorrência natural de amidas nas ligações peptídicas e em decorrência dessas serem grupos doadores de densidade eletrônica menos efetivos que as aminas, essa função orgânica é normalmente empregada no processo de otimização do farmacóforo como no derivado 4-amido **5l**. O caráter parcial de ligação dupla entre C-N faz com a o grupamento amida seja planar restringindo o número de possibilidades de interação da molécula com o alvo. Além disso, o grupo amido é um grupo volumoso, podendo ser interessante para atividade biológica assim como os derivados cloro **1l** e naftil **1h**.

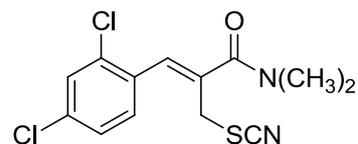
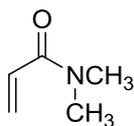
Já análogos planejados contendo isósteros possuem maiores chances de apresentar o mesmo tipo de atividade que o composto de partida. Isósteros possuem propriedades físico-químicas semelhantes, propriedades farmacocinéticas também podem ser similares (PATRICK, 2009) (THOMAS, 2007). Assim, a introdução de um anel piridínico em **5e** ou um anel pirimidínico em 3,5 pirimidil **5j** no lugar da fenila em fenil-alil **1g** e a substituição do grupo naftaleno em naftil-alil **1h** por um grupo quinolínico em 3-quinolil **5f**, inserem hetero-átomos aceptores de ligação de hidrogênio sem que ocorra perda do caráter aromático do substituinte.

A rigidez estrutural está intimamente relacionada com a toxicidade e a atividade de drogas. Estruturas rígidas prendem a molécula em uma determinada conformação, de forma que esta somente será efetiva quando ligada ao seu sítio ativo. Na ausência de rigidez, rotações podem produzir conformações moleculares que sejam capazes de interagir com outros sítios ativos, causando efeitos colaterais ou até mesmo inativação desses sítios. Para estudar os efeitos da rigidez sobre a CIM, propôs-se um análogo de 2,4-cloro **1l**, contendo dois substituintes cloro em diferentes posições do anel aromático como em 2,6-cloro **5g** e um análogo complementar com três substituintes cloro 2,4,6-cloro **5h**. Substituintes nessas posições do anel aromático tendem a impedir que ocorra livre rotação do mesmo devido ao impedimento estérico causado pelo encontro dos cloros com o grupo metileno na posição α ao grupo tiociano. Isso faz com que ocorra uma redução no número de conformações possíveis para a molécula e por consequência no número de tipos de interações com a célula bacteriana.

Além de modificações dos substituintes no anel aromático, podem ser obtidos análogos variando-se a porção éster do farmacóforo (Tabela 4). Visto que o derivado 2,4-cloro **1l** apresentou os menores valores de CIM dentre os compostos avaliados, optou-se por manter essa estrutura do anel aromático. Ésteres normalmente atuam como aceptores de ligação de hidrogênio do ponto de vista químico e são suscetíveis a hidrólise em organismos vivos (PATRICK, 2009). Sua importância pode ser avaliada utilizando os éteres ou ácidos carboxílicos equivalentes, como o composto derivado do etilacrilato **5m** ou o derivado do ácido acrílico **5o**. A introdução de ácidos carboxílicos em moléculas pequenas pode levar a um aumento da solubilidade destes compostos devido à possibilidade da formação de um sal *in vivo* (THOMAS, 2007). Além disso, a formação de um sal também faz com que ocorra a possibilidade de interações iônicas com o substrato.

Tabela 4: Novas gerações de tiocianatos alílicos: modificações no composto α,β -insaturado de partida

Entrada	Composto α,β -insaturado	Análogo
5m		
5n		
5o		
5p		
5q		

5r

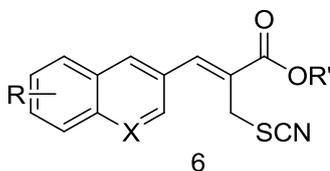
A variação dos substituintes alquila do composto α,β -insaturado de partida permite a avaliação das interações lipofílicas com a célula. Dessa forma a introdução do grupo *tert*-butila (*t*-Bu) em **5n** ou do grupo benzil (Bn) em **5m**, além da avaliação das interações hidrofóbicas com a célula, permite um estudo da seletividade e da conformação da molécula, uma vez que a presença de um grupos volumosos impede que ocorram ataques à carbonila e impede a livre rotação do grupo SCN.

Do ponto de vista químico, cetonas são muito menos reativas que seus análogos ésteres (MCMURRY, 2009). Assim, a produção de um análogo contendo a função cetona **5p** visa estudar a reatividade do grupo carbonílico. A presença do grupo metila (CH_3) no lugar do grupo metóxido (OCH_3) impede que ocorra a hidrólise, dificultando a excreção do composto da célula.

De modo semelhante ao grupamento *t*-Bu a introdução de amidas como em **5q-r** também pode contribuir para o aumento da rigidez estrutural. As amidas são grupos planares pouco reativos devido ao caráter parcial de ligação dupla. Além disso, as amidas secundárias não realizam ligações de hidrogênio devido ao comprometimento do par de elétrons do nitrogênio. Por outro lado, amidas primárias podem atuar como doadoras de ligação de hidrogênio e em meio ácido podem formar sais, aumentando a solubilidade do composto (PATRICK, 2009).

O derivado naftil-alil **1h** também apresentou excelentes valores de CIM (16 $\mu\text{g/ml}$) dentre os compostos avaliados frente a *S. aureus*. Da mesma forma que se utilizou o derivado 2,4-cloro **1l** para construir uma série de análogos variando-se o composto carbonílico α,β -insaturado, uma série de análogos contendo o grupo naftaleno também pode ser construída (Figura 10).

Figura 10: Análogos do composto naftil-alil **1h** para diferentes compostos carbonílicos α,β -insaturados de partida.



R = halogênios, alquil; X = oxigênio ou nitrogênio; R' = H, -CH₂CH₃, *t*-Bu, N(CH₃)₂

De uma maneira geral, agentes antimicrobianos são comparados com base na sua eficiência em testes *in vitro*, no entanto potência nem sempre significa segurança. A atividade inibitória dos compostos pode ser enganosa, uma vez que por mais esforços que sejam empregados para isso, o meio de cultura *in vitro* é muito diferente de um organismo vivo. Dessa forma, ao propor os análogos foi preciso ter em mente a toxicidade de alguns substituintes, como por exemplo, grupos NO₂, e propor estruturas com caráter menos nocivo.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho buscou-se avaliar um grupo de pequenas moléculas sintéticas utilizando o método de micro diluição em caldo frente ao patógeno ESKAPE *S. aureus* e ao patógeno Gram-negativo *E. coli*. Além disso, foram avaliados dois outros patógenos Gram-positivos que são importantes contaminantes de alimentos *B. cereus* e *L. monocytogenes*. A técnica de micro diluição em caldo mostrou-se altamente eficiente, pois proporcionou uma grande quantidade de resultados em um curto período de tempo e sem a demanda de ampla quantidade de reagentes e espaço físico ou de técnicas complementares. Além disso, o método pode ser estendido para a criação de pequenas bibliotecas de compostos que visam a obtenção de compostos líderes para a produção de novas moléculas biologicamente importantes, trabalho que vem sendo realizado em paralelo a este estudo.

Este trabalho permitiu o desenvolvimento de conhecimentos na área da microbiologia, um assunto que não é abordado durante o curso de graduação em Química, além de desenvolver o conceito da interdisciplinaridade que é bastante pertinente para o Químico atual. Foi possível realizar o isolamento e replicação de colônias. Além disso, foi realizado um breve estudo sobre a parede celular de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e propostas algumas relações com os compostos avaliados.

A partir dos resultados obtidos observou-se que nenhum dos compostos avaliados foi efetivo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Por outro lado, frente aos microrganismos Gram-positivos *S. aureus* e *B. cereus*, os compostos contendo substituintes volumosos como halogênios **1j-l** ou como o grupo naftil **1h**, apresentaram CIM na faixa de 16-64 µg/ml, o que demonstra uma dependência da CIM com o tamanho do substituinte no anel aromático. Infelizmente não foi realizável a avaliação dos tiocianatos alílicos frente a bactéria *L. monocytogenes*, uma vez que não foi possível a realização das leituras nas placas preparadas com esse microrganismo. Para a *L. monocytogenes* será necessário o emprego de outro teste de susceptibilidade ou modificações no método empregado neste trabalho que permitam a realização das leituras da CIM.

A análise de REA permitiu a identificação do farmacóforo e possibilitou a proposta de modificações estruturais importantes para o aumento da atividade dos

compostos avaliados tanto pela modificação do aldeído como do composto carbonílico α,β -insaturado. Com base na análise realizada neste trabalho, propôs-se de forma racional dois novos conjuntos de moléculas que também poderão ser efetivas frente aos patógenos ESKAPE e a patógenos alimentares. A síntese e avaliação destes compostos é uma das perspectivas deste trabalho.

7 REFERÊNCIAS

1. ALLAN, R.D., DICKENSON, H. W., HIERN, B. P, JOHNSTON, G. A. R.; KAZLAUSKAS, R. **Isothiouonium compounds as γ -aminobutyric acid agonists.** *Br. J. Pharmac.* 88, 379-387, 1986.
2. BOUCHER, H. W; TALBOT, G. H; BRADLEY, J. S; EDWARDS, J. E. J; GILBERT, D; RICE, L. B; SCHELD, M; SPELLBERG, B; BARTLETT, J; **Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE!** An Update from the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Report on Dev. Pipeline.* 48, 1-12, 2009.
3. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **2011 Annual Reports.** Estados Unidos da América, 2011.
4. CENTERS for Disease Control and Prevention: Antimicrobial Resistance. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>> acesso em 27/10/13.
5. CENTERS for Disease Control and Prevention. E. Coli. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/>> acessado em 01/11/2013.
6. HANNAN, P. C. T; **Guidelines and Recommendations for Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Testing Against Veterinary Mycoplasma Species.** *Vet. Res;* 31, 373-395, 2000.
7. JORGENSEN, J. H., HINDLER, J. F. **New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria.** *Clinical Infectious Diseases;* 44, 280-286, 2007.
8. MCMURRY, J. Química do Benzeno: Substituição Aromática Eletrofílica. In: MCMURRY, J. **Química orgânica vol. 2:** tradução da 6ª norte-americana. Cengage Learning. São Paulo, 2009, 983p.
9. MORVAN, A.; MOUBARECK, C.; LECLERCQ, A.; HERVÉ-BAZIN, M.; BREMONT, S.; LECUIT, M.; COURVALIN, P.; LE MONNIER, A.; **Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 6, 2728-2731, 2010.
10. PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry.** 4th. ed. Oxford. New York. 2009. 752p.
11. PENDLETON, J. N; GORMAN, S. P; GILMORE, B. F; **Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens.** *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 11, 297-308, 2013.
12. PRESCOTT, L. M.; **Microbiology.** 5th. ed. McGraw-Hill College. Boston. 2002. 1147p.
13. PUBLIC Health Agency of Canada. Bacillus cereus. Disponível em: <<http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/bacillus-cereus-eng.php>> Acessado em 12/12/2013.
14. RICE, L. B; **Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens.** *Infec. Control Hosp. Epidemiol.* 31, S1, 7-10, 2010.

15. SÁ, M. M.; FERREIRA, M.; LIMA, E. S.; SANTOS, dos I.; ORLANDI, P. P., FERNANDES, L. **Antimicrobial activity of allylic thiocyanates derived from the Morita-Baylis-Hillman reaction**. 2013, *in press*.
16. SILVEIRA, G. P. **Síntese de Compostos Re-sensibilizadores de Bactérias Resistentes a Antibióticos**. 2006. 197f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
17. SILVEIRA, G. P; FERREIRA, M; FERNANDES, L; MORASKI, G. C; CHO, S; HWANG, C; FRANZBLAU, S. G; SÁ, M. M; **Allylic thiocyanates as a new class of antitubercular agents**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6486-6489, 2012.
18. SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 2nd ed. Elsevier. California. 2004. 617p.
19. TADESSE, D. A.; ZHAO, S.; TONG, E.; AYERS, S.; SINGH, A.; BARTHOLOMEW, M. J.; MCDERMOTT, P. F.; **Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002**. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 5, 741-749, 2012. Disponível em <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/5/pdfs/11-1153.pdf>> acesso em 12/12/2013.
20. TALARO, K. P.; TALARO, A.; **Foundations in Microbiology**. 4th. ed. McGraw-Hill College. Boston. 2002. 889p
21. THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd. 2007. 621p.
22. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre. Artmed, 2000. 827 p.
23. WATTS, J.L.; SHRYOK, T.R.; APLEY, M.; BADE, D.J.; BROWN, S.D.; GRAY, J.T.; HEINE, H.; HUNTER, R.P.; MEVIUS, D.J.; PAPICH, M.G.; SILLEY, P.; ZURENKO, G.E. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard – Third edition**. *CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M31-A3*, 28, 8, 1-99, 2008.
24. WEI, Z; SHI, M; **Recent Advances in Organocatalytic Asymmetric Morita–Baylis– Hillman/ aza-Morita–Baylis–Hillman Reactions**. *Chem. Rev.* 113, 6659-6690,2013.
25. WILKER, M. A., COCKERILL, F. R., CRAIG, W. A., DUDLEY, M. N., ELIOPOULOS, G. M., HECHT, D. W., HINDLER, J.F., LOW, D. E., SHEEHAN, D. J., TENOVER, F. C., TURNIDGE, J. D., WEINSTEIN, M. P., ZIMMER, B. L., FERRARO, M. J., SWENSON, J. M., **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard – Seventh Edition**. *CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M7-A7*, 26, 2, 1-64, 2006.
26. WORLD Health Organization: 10 Facts on antimicrobial resistance. Disponível em: < http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/en/index.html> – acessado em 27/10/13.
27. WORLD Health Organization: Health topics. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/plague/en/>> acesso em 27/10/2013.