

REPOSICIONAMENTO DE CLONAZEPAM COMO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E EFEITO SINÉRGICO COM CIPROFLOXACINO E SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIMA

Tacieli Fagundes da Rosa ¹

Catrine de Souza Machado ²

Vitória Segabinazzi Foletto ³

Marissa Bolson Serafin ⁴

Angelita Bottega ⁵

Rosmari Hörner ⁶

Resumo:

Os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias. Entretanto, houve uma redução significativa no número de antibacterianos aprovados nas últimas duas décadas, e em paralelo, um aumento constante de bactérias multirresistentes (MDR) estão ocorrendo. Assim, o reposicionamento de drogas surgiu como uma alternativa para a identificação mais rápida de medicamentos eficazes contra doenças infecciosas. O medicamento clonazepam pertence a classe dos benzodiazepínicos e é indicado para o tratamento de transtornos de humor. Por ser um medicamento de ampla utilização na sociedade atual, torna-se extremamente interessante e importante a busca dos efeitos do clonazepam frente a cepas bacterianas, já que é um medicamento aprovado para uso pelas autoridades responsáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do medicamento não-antibacteriano clonazepam e associações com os medicamentos antibacterianos ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima frente a microrganismos multirresistentes (MDR). Foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana utilizando o método quantitativo da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do clonazepam isoladamente e em associação com os medicamentos antibacterianos ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima, para verificar a possível ocorrência de sinergismo. A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente a onze cepas bacterianas padrão de referência da coleção American Type Culture Collection (ATCC) e frente a seis isolados clínicos multirresistentes (MDR) provenientes de pacientes atendidos no hospital universitário de Santa Maria, RS, Brasil (HUSM). Posteriormente, foi determinado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), registrado sob o número CAAE 38850614.4.0000.5346. Constatou-se que o medicamento clonazepam não teve atividade bacteriana significativa frente as cepas testadas quando testado isoladamente. No entanto, detectou-se sete eventos de sinergismo desse fármaco quando associado com ciprofloxacino frente a três cepas padrão e quatro isolados clínicos MDR e oito eventos de sinergismo quando associado com sulfametoxazol-trimetoprima, frente a quatro cepas padrão e quatro isolados clínicos MDR. Esses resultados permitem o redirecionamento deste antidepressivo, para ser utilizado em associação com antibacterianos já utilizados na terapêutica (ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima), potencializando a atividade desses fármacos para o tratamento nas infecções bacterianas de microrganismos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* e microrganismo gram-negativo, a *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, são necessários estudos adicionais sobre o mecanismo de ação desses fármacos relacionados às atividades antibacterianas a fim de aumentar a segurança no uso desses medicamentos.

Palavras-chave: Antibacterianos. Bactérias. Clonazepam.

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

REPOSICIONAMENTO DE CLONAZEPAM COMO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E EFEITO SINÉRGICO COM CIPROFLOXACINO E SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIMA

¹ Aluno de pós-graduação. tacielifagundesdarosa@gmail.com. Autor principal

² Aluna de pós-graduação. catrinesmachado@gmail.com. Co-autor

³ Aluna de graduação. vitoria_sfoletto@yahoo.com.br. Co-autor

⁴ Aluna de pós-graduação. marissabolson@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluna de pós-graduação. angelitabotega@yahoo.com.br. Co-autor

⁶ Docente. rosmari.ufsm@gmail.com. Orientador

REPOSICIONAMENTO DE CLONAZEPAM COMO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E EFEITO SINÉRGICO COM CIPROFLOXACINO E SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIMA

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas (COSTA, 2017). Entretanto, houve uma redução significativa no número de antibacterianos aprovados nas últimas duas décadas, e em paralelo, um aumento constante de bactérias multirresistentes (MDR) estão ocorrendo. Assim, as MDR tornaram-se uma questão global de saúde, e com esta ameaça, o desafio de desenvolver novas antibióticos ressurgiu. Nesse sentido, o reposicionamento de drogas emergiu como uma abordagem alternativa para a identificação mais rápida de medicamentos eficazes contra doenças infecciosas (SERAFIN, 2018).

O medicamento clonazepam pertence a classe dos benzodiazepínicos e é indicado para o tratamento de distúrbios epiléticos, transtornos de ansiedade, transtornos de humor e síndromes psicóticas (ANVISA, 2018). Por ser um medicamento de ampla utilização na sociedade atual, torna-se extremamente interessante e importante a busca dos efeitos do clonazepam frente a cepas bacterianas, já que é um medicamento aprovado para uso pelas autoridades responsáveis.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do medicamento não-antibacteriano clonazepam e associações com os medicamentos antibacterianos ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima frente a microrganismos multirresistentes (MDR).

2 METODOLOGIA

Foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana utilizando o método quantitativo da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do clonazepam isoladamente e em associação com os medicamentos antibacterianos ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima para verificar a possível ocorrência de sinergismo. Para obtenção da solução estoque, os medicamentos foram dissolvidos em etanol, sendo testadas as concentrações de 0,5-512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a comprovação da inexistência da atividade inibitória do solvente utilizou-se etanol à 10% em teste realizado isoladamente.

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada frente a onze cepas bacterianas padrão de referência da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo elas gram-negativos (GN): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e gram-positivos (GP): *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus* ATCC 7468. Também avaliou-se a atividade antibacteriana frente a seis isolados clínicos multirresistentes (MDR) provenientes de pacientes atendidos no hospital universitário de Santa Maria, RS, Brasil (HUSM). Desses, três foram de *Staphylococcus epidermidis*, dois de *Klebsiella pneumoniae* e um de *Staphylococcus haemolyticus*. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), registrado sob o número CAAE 38850614.4.0000.5346.

A CIM foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo, baseado no documento M100-S26 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012). O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril, apresentando concentração da suspensão bacteriana conforme a escala 0,5 de Mc Farland, ou seja, $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). Em microplacas de 96 poços contendo caldo Mueller Hinton, os medicamentos (1 a $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os inóculos bacterianos (1×10^{-5} UFC/poço), foram incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após incubação, a CIM foi determinada por meio de leitura visual, como a menor concentração em que não houve crescimento do microrganismo.

Foi determinado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI). A interação entre os medicamentos foi analisada calculando-se o FICI, cuja interpretação é classificada como “sinérgico” ($\text{FIC} \leq 0,5$), “sem interação” ($\text{FIC} > 0,5$ e $\leq 4,0$) e “antagônico” ($\text{FIC} > 4,0$) (ODDS, 2003).

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podemos visualizar os valores de CIM obtidos das análises do clonazepam, ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima, bem como os valores de FICI de suas associações.

Analizando-se os resultados, percebe-se que o clonazepam não apresentou atividade antibacteriana significativa quando testado isoladamente, apresentando valores altos de CIM. Vários medicamentos não-antibióticos são testados para verificar atividade antibacteriana. No entanto, eles possuem altos valores de CIM que não podem ser alcançados clinicamente (YOUNIS, 2015).

Considerando-se os resultados do medicamento não-antibiótico associado com o antibiótico ciprofloxacino, percebe-se que houve efeito sinérgico com clonazepam frente as cepas padrão de *S. epidermidis* ATCC 12228 ($\text{FICI} = 0,25$), *E. faecalis* ATCC 51299 ($\text{FICI} = 0,094$) e *S. aureus* ATCC 25923 ($\text{FICI} = 0,5$) e frente aos isolados clínicos de *S. epidermidis* MDR (A) ($\text{FICI} = 0,094$), *S. epidermidis* MDR (B) ($\text{FICI} = 0,016$), *S. epidermidis* MDR (C) ($\text{FICI} = 0,25$) e *S. haemolyticus* MDR ($\text{FICI} = 0,5$).

Houve efeito sinérgico também na associação do clonazepam com o antibacteriano sulfametoxazol-trimetoprima, frente as cepas padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($\text{FICI} = 0,5$), *S. epidermidis* ATCC 12228 ($\text{FICI} = 0,375$), *E. faecalis* ATCC 51299 ($\text{FICI} = 0,156$), *S. aureus* ATCC 25923 ($\text{FICI} = 0,5$) e frente aos isolados clínicos de *S. epidermidis* MDR (A) ($\text{FICI} = 0,375$), *S. epidermidis* MDR (B) ($\text{FICI} = 0,507$), *S. epidermidis* MDR (C) ($\text{FICI} = 0,5$) e *S. haemolyticus* MDR ($\text{FICI} = 0,507$). Várias drogas comercializadas que atualmente não tem indicações antibacterianas podem matar diretamente as bactérias ou reduzir concentração inibitória mínima do antibiótico quando utilizado em combinação com antibióticos existentes (BROWN, 2015).

Neste estudo, houve atividade antibacteriana do clonazepam principalmente frente a microrganismos gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*) e um microrganismo gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*), quando em associação com medicamentos antibacterianos já utilizados na terapêutica, potencializando-os. Dado o problema crucial colocado pelos patógenos multirresistentes, especialmente os patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*), esforços adicionais precisam ser focados no uso de reaproveitamento de drogas para descobrir novas opções de tratamento (YOUNIS, 2015).

Tabela 1 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do clonazepam, isoladamente e em combinação com ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima frente a cepas padrão e isolados clínicos.

Cepas bacterianas	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	CLON	CIP	CLON+CIP	FICI	SUT	CLON+SUT	FICI
Cepas padrão ATCC							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	1	64	64,25	256	128	0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	256	1	32	34,125	8	128	16,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	256	0,25	64	256,25	1	64	64,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	256	0,5	64	128,25	4	128	32,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	512	512	64	0,25	512	128	0,375
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	256	512	16	0,094	512	32	0,156
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	512	1	64	64,125	1	128	128,25
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	256	2	164	32,25	32	128	4,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	512	4	128	32,25	1	128	128,25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	512	64	64	1,125	256	256	1,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	256	256	64	0,5	256	64	0,5
Isolados clínicos							
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR (A)	256	512	16	0,094	512	64	0,375
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR (B)	512	512	4	0,016	256	128	0,507
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR (C)	512	128	64	0,25	512	128	0,5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> MDR	256	256	64	0,5	512	128	0,507
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR (1)	256	512	256	1,5	512	256	1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR (2)	256	512	512	3	512	256	1,5

CLON, Clonazepam; CIP, Ciprofloxacino; SUT, Sulfametoxazol-Trimetoprima; CLON+CIP, combinação de Clonazepam e Ciprofloxacino; CLON+SUT, combinação de Clonazepam e Sulfametoxazol-Trimetoprima; FICI, Índice de Concentração Inibitória Fracionada; MDR, isolados clínicos multirresistentes.

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visualizando os resultados, concluímos que o não-antibacteriano clonazepam não teve uma atividade antibacteriana significativa frente a todas as cepas padrão ATCC e aos isolados clínicos MDR. No entanto, quando foi associado com o antibiótico ciprofloxacino apresentou efeito sinérgico frente a três cepas padrão e quatro isolados clínicos MDR, sendo todos microrganismos gram-positivos. Houve também efeito sinérgico quando associou-se clonazepam e sulfametoxazol-trimetoprima, frente a quatro cepas padrão ATCC e quatro isolados clínicos MDR, sendo uma cepa padrão de microrganismo gram-negativo e o restante das cepas padrão e isolados clínicos MDR de microrganismos gram-positivos.

Esses resultados permitem o redirecionamento deste benzodiazepínico, para ser utilizado em associação com antibacterianos já utilizados na terapêutica (ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprima), potencializando a atividade desses fármacos para o tratamento nas infecções bacterianas de microrganismos gram-positivos, como *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e microrganismo gram-negativo, a *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, são necessários estudos adicionais sobre o mecanismo de

ação desses fármacos relacionados às atividades antibacterianas a fim de aumentar a segurança no uso desses medicamentos.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Clonazepam – Sun Farmacêutica do Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2018. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8688542015&pIdAnexo=2876451>. Acesso em: 04 set. 2018.

BROWN, D. Antibiotic resistance breakers: repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? **Nature reviews**, v. 14, p. 821-832, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07–A9. Wayne, USA: **CLSI**; 2012.

COSTA, A. L. P. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

ODDS, F. C. Synergy, antagonismo, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p.1, 2003.

SERAFIN, M. B.; HÖRNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 252-256, 2018.

YOUNIS, W.; THANGAMANI, S.; SELEEM M. N. Repurposing non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 28, p. 4106-4111, 2015.