

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DO FÁRMACO NÃO-ANTIBIÓTICO ANLODIPINO

Silvana Silveira Coelho ¹

Marissa Bolson Serafin ²

Angelita Bottega ³

Tacieli Fagundes da Rosa ⁴

Vitória Segabinazzi Foletto ⁵

Rosmari Hörner ⁶

Resumo:

O aumento de doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes é considerado ameaça potencial para a saúde pública. Ainda, a evolução da resistência destes microrganismos ocorre de forma tão vertiginosa que não tem sido possível o acompanhamento da pesquisa por novos compostos e consequentemente reduz o arsenal terapêutico disponível para tratamento. Assim, o redirecionamento de fármacos torna-se imprescindível para a descoberta de novos fármacos não-antibióticos, uma vez que é mais rápido, baixo custo e maior segurança para o paciente. Foram relatados na literatura que medicamentos cardiovasculares são agentes promissores para tratamentos de infecções bacterianas sendo que o anlodipino, comumente utilizado para o tratamento de hipertensão, tem demonstrado grande atividade frente a diferentes cepas bacterianas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana in vitro do fármaco não-antibiótico anlodipino frente a diferentes cepas padrão de referência American Type Culture Collection (ATCC) através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foi possível observar que este medicamento apresentou atividade antibacteriana em todas as cepas testadas, com a CIM variando de 32-128 g/ml. Ainda, demonstrou menores valores de CIM nas cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 51299 (= 32 g/ml) seguido de *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 7468 sendo mais efetivo frente às bactérias Gram-positivas. Pode-se observar que todas as cepas apresentaram atividade bactericida frente ao composto em estudo, com CBM variando de 64 a 256 µg/ml, em especial nas cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Escherichia coli* ATCC 35218 (64 µg/ml). Evidenciamos neste estudo que o medicamento testado apresentou atividade antibacteriana e bactericida notória frente a todas as cepas padrão de referência testadas, principalmente contra Gram-positivas. O que sugere que o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica como o anlodipino, constitui uma alternativa terapêutica eficaz para o tratamento de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Reposicionamento, resistência bacteriana, anlodipino.

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DO FÁRMACO NÃO-ANTIBIÓTICO ANLODIPINO

¹ Aluno de pós-graduação. silvana.scoelho@hotmail.com. Autor principal

² Aluno da pós-graduação. marissabolson@gmail.com. Co-autor

³ Aluno da pós-graduação. angelitabottega@yahoo.com.br. Co-autor

⁴ Aluno da pós-graduação. tacielifagundesdarosa@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno da graduação. vitoria_sfoletto@yahoo.com.br. Co-autor

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO FÁRMACO NÃO-ANTIBIÓTICO ANLODIPINO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças infecciosas representam quase um quinto da mortalidade mundial todos os anos. O aumento dos microrganismos multirresistentes (MDR), tem tornado um desafio o tratamento destas patologias e, além disto, também é considerado uma ameaça potencial para a saúde pública (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

A taxa atual de antibacterianos aprovados para a terapêutica é relativamente baixa quando comparados com décadas passadas, visto que o desenvolvimento de novos compostos para uso clínico é trabalhoso, principalmente pelo longo período necessário e aos custos elevados para sua fabricação (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Paralelamente a isto, a evolução da resistência das bactérias MDR ocorre de forma tão vertiginosa que não tem sido possível o acompanhamento da pesquisa por novos compostos e assim, reduz consideravelmente o arsenal terapêutico disponível (CARVALHO; FONTES, 2014; KARAM et al., 2016; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

O redirecionamento de fármacos é uma abordagem eficaz na descoberta de fármacos não-antibióticos que expressam atividade antibacteriana, provavelmente com mecanismos de ação diferentes dos já existentes. (MAZUMDAR et al., 2010). Este método atual constitui campo de pesquisa ativa, pois promove a descoberta acelerada dos medicamentos, tem baixo custo e maior segurança para o paciente, uma vez que estudos toxicológicos e farmacológicos já foram realizados (MEHNDIRATTA et al., 2016; PALIT et al., 2013). Foram relatados na literatura que medicamentos cardiovasculares são agentes promissores para tratamentos de infecções bacterianas sendo que o anlodipino, comumente utilizado para o tratamento de hipertensão, tem demonstrado grande atividade frente a diferentes cepas bacterianas. (DUTTA et al., 2009; KUMAR et al., 2003; MAZUMDAR et al., 2010; PALIT et al., 2013).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do fármaco não-antibiótico anlodipino frente a diferentes cepas padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

2 METODOLOGIA

O anlodipino foi adquirido comercialmente na forma de seu sal. A atividade antibacteriana foi avaliada frente a diferentes cepas ATCC, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* spp. ATCC 52117, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Micrococcus luteus* ATCC 7468.

As cepas estavam armazenadas em glicerol, foram repicadas em placas contendo *Trypticase-soy agar* (TSA) e foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após, a CIM foi determinada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O anlodipino foi diluído em metanol na concentração 20.480 µg/ml e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 1.024 µg/mL a 1 µg/mL em triplicata. As placas contendo os microrganismos e o composto foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. A CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços.

A CBM foi realizada conforme o método descrito no documento M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1999) determinada como a menor concentração requerida para matar o microrganismo.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados os valores obtidos de CIM do anlodipino frente às cepas ATCC.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) do anlodipino frente às cepas padrão de referência ATCC.

Cepas bacterianas padrão ATCC	CIM (µg/ml)
Gram-positivas	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	64
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	64
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	32
Gram-negativas	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	128
<i>Salmonella</i> spp. ATCC 52117	128

Fonte: do autor, 2018.

Foi possível observar que este medicamento apresentou atividade antibacteriana em todas as cepas testadas, com a CIM variando de 32-128 µg/ml. Ainda, demonstrou menores valores de CIM nas cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 51299 (= 32 µg/ml) seguido de *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 7468 sendo mais efetivo frente às bactérias Gram-positivas.

Diferentes estudos avaliaram o potencial papel do não antibiótico anlodipino no tratamento de infecções bacterianas, relatando que este medicamento possui atividade bacteriana significativa dentre diferentes medicamentos cardiovasculares. Apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em doses não tóxicas. (MAZUMBAR et al., 2010; DUTTA et al., 2009; KUMAR et al., 2003)

Alguns pesquisadores sugerem que se este medicamento pode ser utilizado como um composto auxiliar que quando associados a outros antibióticos, poderá superar o desenvolvimento de resistência prevista pelos microrganismos (MADZUMAR et al., 2010; PALIT et al., 2013).

Os valores da CBM frente ao anlodipino podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração bactericida mínima (CBM) do anlodipino frente as cepas padrão de referência ATCC.

Cepas bacterianas padrão ATCC	CBM (µg/ml)
Gram-positivas	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	128

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	128
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468	128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	64
Gram-negativas	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	256
<i>Salmonella</i> spp. ATCC 52117	128

Fonte: do autor, 2018.

Pode-se observar que todas as cepas apresentaram atividade bactericida frente ao composto em estudo, com CBM variando de 64 a 256 µg/ml, em especial nas cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Escherichia coli* ATCC 35218 (64 µg/ml). É relatado na literatura que o anlodipino possui efeito bactericida levando a morte intracelular, atingindo o macrófago ao invés da bactéria, e com isso teria capacidade de reduzir prováveis mecanismos de resistência ao medicamento (MAZUMBAR et al., 2010; PALIT et al., 2013).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidenciamos neste estudo que o medicamento testado apresentou atividade antibacteriana e bactericida notória frente a todas as cepas padrão de referência testadas, principalmente contra Gram-positivas. O que sugere que o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica como o anlodipino, constitui uma alternativa terapêutica eficaz para o tratamento de infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, J. F., FONTES, F. L. Revisão dos achados sobre cepas *Staphylococcus aureus* resistentes no Brasil entre 2010-2013. Arq. Ciênc. Saúde, Rio Grande do Norte, v. 21, n. 3, p. 28-35, 2014.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07–A9. Wayne, USA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2012.
- DUTTA, N.K. et al. In vitro and in vivo efficacies of amlodipine against *Listeria monocytogenes*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009;7:849–53.
- KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. Critical Care, v. 20, p. 2-9, 2016.
- KUMAR, K.A. et al. Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. Acta Microbiol Pol 2003;52:285–92.
- MAZUMBAR, K. et al. Antimicrobial potentiality of a new non-antibiotic: the cardiovascular drug oxyfedrine hydrochloride. Microbiological Research, v. 158, p.259-264, 2003.

MEHNDIRATTA et al. Drug repositioning. *International Journal of Epilepsy*, v. 3, p. 91-94, 2016.

NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial agents; Approved Guideline, NCCLS document M26-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1999.

PALIT P., MANDAL S.C., MANDAL N.B. Reuse of old, Existing, Marketed Non-antibiotic Drugs as Antimicrobial Agents: a New Emerging Therapeutic Approach. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex; 2013.

ZHENG, W., SUN, W., SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. ***British Journal of Pharmacology***, v. 175, p. 181-191, 2018.