

AValiação DA Atividade Antibacteriana in vitro DO Cloridrato de Amitriptilina

Augusto Dias da Mota ¹

Laísa Nunes Franco ²

Amanda Mainardi ³

Vitória Segabinazzi Foletto ⁴

Rosmari Horner ⁵

Catrine de Souza Machado ⁶

Resumo:

O uso de antibióticos na população revolucionou o tratamento de doenças causadas por bactérias, reduzindo assim as taxas de morbidade e mortalidade. Entretanto, o uso irracional de antimicrobianos vem ameaçando o tratamento de infecções bacterianas e consequentemente acelerando o processo natural de resistência das bactérias a medicamentos, desencadeando um problema a nível global. Com isso, neste estudo, foi utilizado o Cloridrato de Amitriptilina, antidepressivo tricíclico (ADT), que possui sua estrutura relacionada à dos fenotiazídicos. Este fármaco possui atividade farmacológica não só antidepressiva, mas como tratamento da dor crônica neuropática e/ou por nocicepção, da neuralgia pós-herpética e na profilaxia da enxaqueca. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana in vitro do antidepressivo Cloridrato de Amitriptilina frente a cepas bacterianas padrão de referência ATCC. Foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), através do método de microdiluição em caldo. As cepas foram acondicionadas em caldo TSB que continha 15% de glicerol, sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. O fármaco foi preparado até a concentração 512 µg mL⁻¹ e o inóculo feito em salina estéril. A seguir, utilizou-se microplacas de 96 orifícios, contendo caldo Müller-Hinton, o medicamento e o inóculo foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas, após isso, a CIM foi determinada por leitura visual. Posteriormente, foram retirados em torno de 10L de cada poço que não teve crescimento bacteriano visível e do último poço onde houve o crescimento para controle positivo, assim realizou-se o método de concentração bactericida mínima (CBM). Este volume foi semeado em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, ficando incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Depois da incubação, a CBM foi determinada como a menor concentração requerida para matar o microrganismo. O Cloridrato de Amitriptilina apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222 e *Escherichia coli* ATCC 35218, mostrando assim sua capacidade contra microrganismos Gram positivos e Gram negativos. Sendo assim, este trabalho apresentou resultados significativos frente à atividade antibacteriana do Cloridrato de Amitriptilina, colaborando para descoberta de novos fármacos com atividade antibacteriana já existente no mercado e com atividades farmacológicas e farmacocinéticas conhecidas.

Palavras-chave: Amitriptilina, antimicrobiano, microrganismo

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DO CLORIDRATO DE AMITRIPTILINA

¹ Aluno de graduação. augustodiasdamota@gmail.com. Autor principal

² ALuna de Graduação em Farmácia. francolaisa5@gmail.com. Co-autor

³ ALuna de Graduação em Farmácia. maainardiamanda@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluna de Graduação em Farmácia. vitoria_sfoletto@yahoo.com.br. Co-autor

⁵ Docente. rosmari.ufsm@gmail.com. Orientador

⁶ Aluna de pós graduação no PPGCF. catrinesmachado@gmail.com. Co-orientador

AValiação DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO CLORIDRATO DE AMITRIPTILINA

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a rápida disseminação de microrganismos antibióticos resistentes ameaça o tratamento de infecções bacterianas, por causa da resistência a antibiótico relacionada ao uso inadequado do mesmo. (KARAM, G. *et al.*, 2016) Com isso, a resistência bacteriana torna-se um problema de saúde pública muito relevante a nível global, por apresentar consequências clínicas e econômicas e pelo aumento da morbidade e mortalidades relacionadas devido ao uso inadequado dos antibióticos. (LOUREIRO, R. J. *et al.*, 2016) A resistência aos antibióticos é acelerada por uma combinação de fatores, como atividade em saúde, agricultura e contaminação ambiental. Estima-se que as infecções resistentes aos medicamentos causam 700.000 mortes por ano em todo o mundo. (WHO/CDC/ICBDSR, 2017)

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico (ADT), tem sua estrutura estreitamente relacionada à dos fenotiazídicos e é amina terciária com dois grupos metila fixados ao átomo básico de nitrogênio. Os ADTs têm como principal efeito, o bloqueio da recaptura das aminas pelas terminações nervosas por competição pelo sítio de ligação do transportador de aminas (RANG & DALE 2007).

Diversas terapias com a amitriptilina são relatadas, tais como tratamento da dor, principalmente a dor crônica neuropática e/ou por nocicepção, da neuralgia pós-herpética (SILVA F.C, *et al.* 2008) e na profilaxia da enxaqueca (SANTIAGO M.D.S. *et al.* 2014)

A resposta da sociedade para reduzir a resistência antimicrobiana envolve vigilância, uso reduzido, melhor controle de infecções e a introdução de novos agentes antimicrobianos, (HAWKEY PM, 2008) com isso, considerando a importância do problema de resistência bacteriana, pesquisadores estão tentando descobrir a atividade antibacteriana em algumas classes de medicamentos já existentes no mercado, os chamados “não antibióticos” englobam medicamentos como anti-hipertensivos, antipsicóticos, anti-inflamatórios, antidepressivos, entre outros. (MUTHUKUMAR. V, JANAKIRAMAN. K., 2014) Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do antidepressivo Cloridrato de Amitriptilina frente a cepas bacterianas padrão de referência ATCC.

2 METODOLOGIA

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada em quatro cepas bacterianas padrão de referência da coleção *American Type Culture Collection (ATCC)*. Estas cepas são acondicionadas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) contendo 15% de glicerol a 20°C, no Laboratório de Bacteriologia (Labac). Foram testadas cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e cepas Gram negativos de *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 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 avaliação da atividade antibacteriana foi efetuada com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através do método de microdiluição em caldo, baseado no documento M100-S26 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2012).

O cloridrato de amitriptilina foi dissolvido e diluído até a concentração de 512 µg mL⁻¹ para obtenção das soluções estoque. O inóculo bacteriano foi feito em solução salina estéril, alcançando turbidez padrão da escala 0,5 de McFarland. Em microplacas de 96 orifícios, contendo caldo Müller-Hinton, o medicamento (0,25 a 256 µg mL⁻¹) e inóculo bacteriano (1 x

10^{-5} UFC/poço), foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após incubação, a CIM foi determinada por meio de leitura visual.

Posterior à leitura visual da CIM, foram retirados em torno de 10µL do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível e também do último poço onde houve crescimento bacteriano visível para ser usado como controle positivo para a realização da determinação da concentração bactericida mínima (CBM), este método foi descrito no documento M26-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) em 1999 (NCCLS, 1999), com algumas alterações. Este volume foi semeado em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton, ficando incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Depois da incubação, a CBM foi determinada como a menor concentração requerida para matar o microrganismo.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Pode-se observar, de acordo com a tabela 1, que o Cloridrato de Amitriptilina exibiu atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CIM=64 µg mL⁻¹) e *Escherichia coli* ATCC 35218 (CIM= 128 µg mL⁻¹), ou seja, as concentrações determinadas previnem o crescimento bacteriano, corroborando assim com a literatura que mostra atividade da amitriptilina contra microrganismos gram positivos e gram negativos. (MUTHUKUMAR. V, JANAKIRAMAN. K., 2014) Mandal e colaboradores investigaram a atividade antimicrobiana da amitriptilina tanto in vitro quanto in vivo, constatando sensibilidade frente à *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Vibrio cholerae*, *Micrococcus* spp., *Lactobacillus sporogenes* e *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas* spp., mas foi resistente a *Enterococcus faecalis*, *Proteus* spp., *Enterobacter cloacae*, *Hafnia* spp. e *Providencia* spp. Apresentou também, atividade antifúngica frente à *Cryptococcus* spp. e *Candida albicans*. (MANDAL, A. et al, 2010) A concentração bactericida mínima, ou seja, a menor concentração do medicamento capaz de causar morte do microrganismo, não demonstrou valor significativo frente a nenhuma ATCC.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Cloridrato de Amitriptilina em ATCCs.

	CIM	CBM
ATCC	Cl. Ami (µg mL ⁻¹)	Cl. Ami (µg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>512	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64	512
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	128	512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	=512	-

Fonte: do autor, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O problema de resistência antibacteriana faz com que pesquisadores se animem para a pesquisa de novas drogas com atividade frente às bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR). O resultado da nossa pesquisa in vitro colaborou para a descoberta de novos fármacos com atividade antibacteriana através de fármacos com atividades farmacológicas já

conhecidas, termo conhecido como reposicionamento de drogas. Com isso, o cloridrato de amitriptilina, um antidepressivo da classe tricíclico, mostrou atividade antibacteriana frente a cepas de bactérias gram positivas e gram negativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07–A9. Wayne, USA: CLSI; 2012.

HAWKEY PM. The growing burden of antimicrobial resistance. JAntimicrob Chemother. 2008;62 Suppl 1:i1–9.14

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. Critical Care, v. 20, p. 2-9, 2016.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. Revista Portuguesa de Saúde Pública, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MANDAL, A. et al. An investigation on in vitro and in vivo antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. Brazilian Journal of Microbiology v.41, p. 635-642, 2010.

MUTHUKUMAR. V, JANAKIRAMAN. K. Evoluotion Of Antibacterial Activy Of Amitriptyline Hydrochloride. International journal of chem tech research CODEN (USA), v.6, oct-nov 2014.

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

RANG & DALE Farmacologia/ H. P. Rang... {et al.}; {tradução de Raimundo Rodrigues Santos e outros}. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007

SANTIAGO M.D.S. et al. Amitriptyline and aerobic exercise or amitriptyline alone in the treatment of chronic migraine: a randomized comparative study. Arq Neuropsiquiatria, v. 72, p. 851-855, 2014

SILVA F.C. et al. Prevenção da dor fantasma com uso de cloridrato de amitriptilina. Revista Brasileira de Cancerologia, v.54, p. 345-349, 2008.

WHO/CDC/ICBDSR. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017.