

Atividade antibacteriana de um composto triazenido com ouro frente a cepas bacterianas e isolados clínicos

Actividad antibacteriana de un triazenido compuesto de oro frente a las cepas bacterianas y los aislados clínicos

Antibacterial activity of gold complexed triazenid against bacterial strains and clinical isolates

M. Melise Silveira Nunes,^I M. Litiérri Razia Garzon,^I Dra. Rosiéli Martini,^I Dra. Roberta Filipini Rampelotto,^I Dra. Aline Locatelli,^{II} Prof. Manfredo Hörner,^I Prof. Rosmari Hörner^I

^I Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

^{II} Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Introdução: de uma forma alarmante, estudos demonstraram que nos últimos anos ocorreu um grande aumento na resistência bacteriana frente aos antibióticos. Consequentemente, há uma grande necessidade de descoberta de novas substâncias ativas, e entre essas, os compostos trizenos vêm demonstrado-se como uma classe promissora de metalofármacos, com significativa atividade antimicrobiana. Além do mais, a associação do radical farmacofórico trizenos com metais, como o ouro, favorece a produção de moléculas com maior atividade biológica.

Objetivo: avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do composto trizenos inédito complexado com ouro no estado de oxidação I {(1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil) triazenido(trifenilfosfina)ouro(I)}, frente a cepas bacterianas padrões de referência *American Type Culture Collection* e isolados clínicos com resistência múltipla as drogas (MDR).

Métodos: a atividade antibacteriana do composto trizenos foi determinada através do método de Concentração Inibitória Mínima, baseado no *Clinical and Laboratory Standards Institute* de 2012. A CIM foi caracterizada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição.

Resultados: o composto em estudo apresentou pronunciada atividade antibacteriana, sendo ativo em 43,4 % (10/23) das bactérias testadas, mostrando-se seletivo frente a cepas Gram positivas.

Conclusão: o complexo trizenos apresentou estreito espectro de ação, sendo ativo somente frente aos microrganismos classificados como Gram positivos, demonstrando assim uma alternativa para a concepção de uma nova classe de metalofármacos com atividade antibacteriana.

Palavras-chave: trizenos, atividade antibacteriana, ouro, resistência.

RESUMEN

Introducción: de una manera alarmante, los estudios han demostrado que en los últimos años hubo un gran aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Por consiguiente, hay una gran necesidad para el descubrimiento de nuevas sustancias activas, y entre estas, los compuestos trizenos se muestran como una clase prometedora de metalofármacos con actividad antimicrobiana significativa. Por otra parte, la asociación de triazeno farmacóforo radical con metales como el oro favorece la producción de moléculas con actividad biológica superior.

Objetivo: evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del compuesto sin precedentes triazeno complejoado con oro en el estado de oxidación I $\{(1-(2\text{-bromofenil})-3-(2\text{-nitrofenil})\text{triazenido}(\text{trifenilfosfina})\text{ouro(I)}\}$, frente a las cepas de las normas bacterianas, cepas de referencia *American Type Culture Collection* y los aislados clínicos con resistencia múltiple a los medicamentos.

Métodos: la actividad antibacteriana del triazeno compuesto se determinó por el método de la concentración inhibitoria mínima, sobre la base de estándares clínicos y de laboratorio de 2012. Este método se caracteriza visualmente como la menor concentración que inhibió completamente el crecimiento de microorganismos en los pocillos de dilución.

Resultados: el compuesto de ensayo mostró actividad antibacteriana pronunciada, el cual fue activo en 43,4 % (10/23) de las bacterias ensayadas, uy mostró ser selectivo contra las cepas grampositivas.

Conclusión: el complejo triazeno mostró estrecho espectro de acción, el cual es activo solo frente a los microorganismos clasificados como grampositivos, lo que demuestra una alternativa para la concepción de una nueva clase de metalofármacos con actividad antibacteriana.

Palabras clave: trizenos, actividad antibacteriana, oro, resistencia.

ABSTRACT

Introduction: several studies have revealed that the increase of bacterial resistance to antibiotic is really alarming in the last few years. Consequently, the discovery of new active substances is a must and the triazene compounds appear as a promising class of metal drugs with significant antimicrobial action. On the other hand, the association of radical pharmacoporous triazene with metals such as gold facilitates the production of greater biological action molecules.

Objective: to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of this unprecedented compound called gold complexed with triazene at oxidation state I $\{(1-(2\text{-bromophenyl})-3-(2\text{-nitrophenyl})\text{triazenide}(\text{triphenylphosphane})\text{gold(I)}\}$

against the bacterial standard strains, American Type Culture Collection reference strains and the multiple drug resistance clinical isolates.

Methods: the antibacterial activity of the compound triazene was estimated by the minimal inhibitory concentration method on the basis of the clinical and laboratory standards 2012. This method is visually characterized as the lowest concentration that fully inhibited the bacterial growth in the dilution wells.

Results: the tested compound showed significant antibacterial activity, being active in 43.4 % (10/23) of tested bacteria and selective for Gram-positive strains.

Conclusions: triazene complex showed narrow action spectrum since it is only active against Gram-positive microorganisms, which is in turn an alternative for conception of a new class of metal drugs with antibacterial action.

Keywords: triazenes, antibacterial activity, gold, resistance.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos em terapias empíricas tem sido o grande contribuinte para o aumento da resistência bacteriana, diminuindo assim o arsenal de drogas disponíveis.¹ Embora novos fármacos encontram-se em desenvolvimento, de acordo com a literatura nenhuma nova classe de antimicrobianos foi descoberta nos últimos anos.² A busca por novos fármacos tem sido a importante meta da química medicinal, principalmente, por fármacos inovadores, que possam ser mais eficientes para o tratamento das infecções, com novos mecanismos de ação e que não sejam reconhecidos pelas bactérias.³ Em razão disso, os compostos triazenos (TZC) são descritos como uma classe de substâncias químicas com promissora atividade antibacteriana.^{4,5}

Os TCZs constituem uma classe de compostos caracterizados pela presença do grupo triazenídico, que contém uma cadeia alifática com três átomos de nitrogênio interligados em seqüência (N= N-N).⁶ Compostos desta classe são capazes de interagir com a molécula de Ácido Desoxirribonucléico (DNA), conferindo diferentes propriedades biológicas já comprovadas, tais como antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias, citotóxicas e de nucleasse química através da clivagem do DNA.^{4,5,7} Além do mais, possuem atividade antimicrobiana relatada desde 1966 contra *Aspergillus flavus*, *Cândida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium phlei*.⁸

Ao associar o radical farmacofórico TZC com metais que possuem atividade biológica como o ouro, pode-se ampliar a atividade biológica, devido que muitas metalodrogas imitam a função biológica das enzimas humanas clivando, dessa forma, o DNA sob condições fisiológicas.⁹

Em vista disso, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo *in vitro*, avaliando a atividade antibacteriana de um composto TZC inédito complexado com ouro, frente a cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos com resistência múltipla as drogas (MDR), obtidos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul.

MÉTODOS

COMPOSTO TRIAZENO

O composto triazeno complexado com ouro no estado de oxidação I $\{(1-(2\text{-nitrofenil})-3-(2\text{-bromofenil})\text{triazenido}(\text{trifeilfosfina})\text{ouro (I)}\}$ (Fig.), foi previamente sintetizado e caracterizado no Núcleo de Investigação de Triazenos e Complexos (NITriCo) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

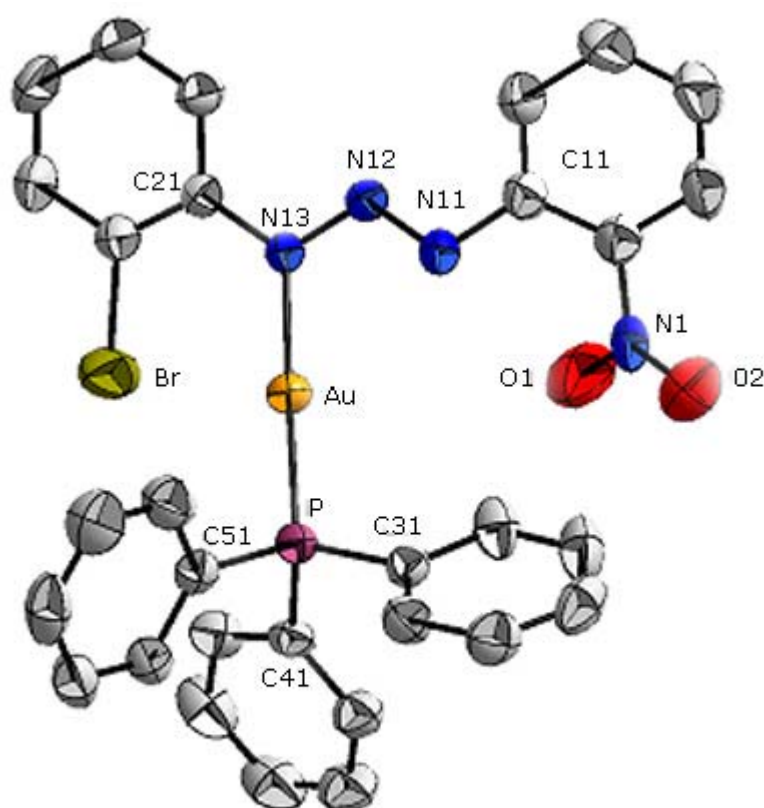


Fig. Projeção estrutural do complexo composto $\{[1-(2\text{-bromofenil})-3-(2\text{-nitrofenil})\text{triazenido}(\text{trifeilfosfina})\text{ouro (I)}\}$.

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana *in vitro* do composto TZC foi avaliada frente a 12 cepas bacterianas ATCC, sendo elas Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27859, *Salmonella thyphymurium* ATCC 14028. Gram positivas: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.

Também foram avaliados 11 isolados clínicos MDR, obtidos no Laboratório de Microbiologia do HUSM, sendo eles, GN: *Acinetobacter baumannii* MDR 34, *A. baumannii* MDR 47, *E. coli* MDR 329, *K. pneumoniae* MDR 806, *K. pneumoniae* MDR 983 e *P. aeruginosa* MDR 64. GP: *S. aureus* MDR 27, *S. aureus* MDR 28, *S. aureus* MDR 31, *S. epidermidis* MDR 27, *S. epidermidis* MDR 102.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A ativação das bactérias desse estudo foi realizada utilizando o meio ágar de soja e tripticaseína (TSA), por 24 h a 35 ± 2 °C. A atividade antibacteriana do composto TZC foi determinada através do método de microdiluição em caldo, baseado no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2012.¹⁰ O composto estudado foi diluído em etanol e água (1:1) na concentração 2 560 µg/mL e após foram realizadas sucessivas diluições nas concentrações de 128 µg/mL a 0,25 µg/mL. As placas contendo os microrganismos e o composto foram incubados a 35 ± 2 °C por 24 h. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada visualmente, como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de diluição. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Conceitos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 0169.0.243.000-08.

RESULTADOS

Dentre o total de cepas e isolados bacterianos testados, 10 de 23 (43,48 %) apresentaram valores significativos de CIM, apenas em bactérias GP (tabela). Analisando os resultados obtidos para o gênero *Staphylococcus*, 7 das 9 cepas (77,78 %) apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que o melhor potencial antibacteriano do composto em estudo foi evidenciado frente ao isolado MDR de *S. aureus* 26 com valor de CIM de 16 µg/mL.

Tabela. Perfil de atividade do composto
 {[1-(2-bromofenil)-3-(2-nitrofenil)triazenido(trifeilfosfina)ouro (I)
 frente às cepas ATCC e isolados bacterianos MDR

Cepas ATCC e isolados bacterianos MDR	CIM (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	64
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	32
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	64
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	64
<i>Staphylococcus aureus</i> MDR 27	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR 27	64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR 102	64

A cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, apresentou pronunciada atividade, possuindo uma CIM de 32 µg/mL. O composto mostrou concordância frente as três cepas de *S. epidermidis*, tendo valor de CIM de 64 µg/mL, sendo uma ATCC e duas MDR. O composto também foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *B. cereus* ATCC 1457, *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* ATCC 2592, *S. aureus* ATCC 2921, *S. saprophyticus* ATCC 15305, com valor de CIM de 64 µg/mL. Já, para os demais, o composto obteve valores de CIM >128 µg/mL.

DISCUSSÃO

O composto TZC em estudo demonstrou estreito espectro, entretanto, apresentou pronunciada atividade antibacteriana frente a bactérias GP, em cepas ATCC e isolados MDR, registrando valores de CIM entre 16-64 µg/mL. Esses resultados podem ser explicados devido a diferença na estrutura da parede celular das bactérias GP, as quais possuem uma estrutura celular menos complexa, composta de espessa camada de peptidoglicano. Como as bactérias GP necessitam do peptidoglicano para sua proteção e manutenção da pressão osmótica, os resultados podem estar relacionados com a inibição da síntese do mesmo, conduzindo assim a morte celular.¹¹ Barreiro e colaboradores relatam que o metal ouro age inibindo a proliferação bacteriana, dessa forma, ocorre o bloqueio da citocinese celular.¹²

O composto em estudo mostrou-se mais efetivo frente o isolado clínico designado como *S. aureus* MDR 27. Resultados relevantes, visto que esse isolado trata-se de um *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), gene *mecA* positivo e que apresentou sensibilidade somente a daptomicina, linezolida e vancomicina, antimicrobianos de uso intravenoso. Sem dúvida, esse é o patógeno mais importante entre os *Staphylococcus*, caracterizado como causador de uma variedade de processos infecciosos, que incluem desde infecções cutâneas benignas até doenças potencialmente fatais.¹³ Em um estudo realizado com a finalidade de comparação de compostos análogos com prata e ouro evidenciou-se que o ouro, geralmente apresenta melhor atividade do que os análogos da prata, principalmente frente ao *S. aureus*.¹² Além disso, em outra pesquisa também efetuada em 2012, utilizando o metal ouro complexado com rimantadina, demonstrou a capacidade desse composto em inibir o *S. aureus*, relatando valores de CIM entre 6.25-100 g/mL.¹⁴

Em relação à espécie de *S. epidermidis* o composto apresentou-se eficaz frente a todas as cepas e isolados testados, tendo extrema relevância, uma vez que os isolados multirresistentes foram oriundos da corrente sanguínea de pacientes internados no HUSM. Esses isolados tratavam-se de um *S. epidermidis* metilina resistente (MRSE), genes *mecA* e *icaD* positivos, ou seja, produtores de biofilme. Além disso, apresentou sensibilidade apenas a vancomicina, clindamicina, tigeciclina e teicoplanina. Resultados semelhantes foram encontrados por Hörner e colaboradores, que estudaram 15 compostos TZC e um deles apresentou resultado semelhante ao encontrado em nossa análise, demonstrando eficácia frente a dois isolados de *S. epidermidis* MDR.⁴ Roymahapatra e colaboradores em sua pesquisa, com complexos de ouro com pirazina, evidenciaram que esses compostos quando associados ao ouro, são capazes de inibir a formação de biofilme em bactérias GP, isto se deve a possibilidade de um aumento na permeabilidade da membrana celular bacteriana.¹⁵

Em relação a atividade frente ao *B. cereus*, dados semelhantes ao nosso foram reportados em uma pesquisa realizada em 2010, no qual averiguaram compostos TZC e destacaram uma melhor atividade antibacteriana frente a cepa de *B. cereus*,

com CIM de 32 µg/mL.⁷ Esse microrganismo tem sua patogenicidade relacionada às infecções alimentares, ou até mesmo infecções cutâneas acompanhadas de bacteremia, septicemia entre outras.¹⁶

O gênero *Enterococcus* também se mostrou susceptível ao composto TZC do nosso estudo, dentre duas cepas de *E. faecalis* testadas, ambas apresentaram valores significativos de atividade antimicrobiana, sendo que uma delas com CIM de 32 µg/mL. Esses resultados são de extrema importância, pois as bactérias testadas tratam-se de *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), importante patógeno que vem sendo isolado com elevada frequência nos hospitais. Pesquisas demonstram a alta incidência de isolamento de bactérias caracterizadas como VRE, em uma análise realizada no Hospital Universitário de Uberaba, em Minas Gerais, constatou que as duas cepas de *E. faecalis* isoladas expressaram alto nível de resistência a vancomicina, com CIM > 256 µg/mL.¹⁷ Nossos resultados são semelhantes ao estudo efetuado por Yeo e colaboradores em 2013, no qual relataram que três dos compostos trifenilfosfina ouro, foram capazes de inibir a cepa de *E. faecalis* testada.¹¹

Sugere-se que compostos TZCs, como o desse estudo, atuam como quelantes, inibindo etapas da síntese bacteriana^{4,11} e clivando o DNA,⁸ conduzindo assim a morte celular. Além disso, a toxicidade relativamente baixa da família do ouro permite que fármacos com esse elemento sejam utilizados para consumo humano.¹⁸

CONCLUSÃO

O composto TZC complexado com o metal ouro mostrou-se seletivo e com espectro de ação reduzido, sendo ativo frente a cepas e isolados GP, demonstrando ser uma alternativa na concepção para nova classe de metalofármacos com atividade antibacteriana. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados, para a avaliação de outros parâmetros biológicos, bem como, a sua toxicidade e a eficácia terapêutica.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar sua gratidão a CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Azevedo CP, Silva JD. Avaliação do perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de uroculturas e correlação com antibioticoterapias empíricas atualmente propostas. Rev Multidiscip Saúde. 2012;4(7):2-17.
2. Chopra I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. J Antimicrob Chemother. 2012;68:496-505.
3. Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti ECP, et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburanacearensis* A. C. Smith and *Anadenantheramacrocarpa* (Benth.) Brenan. Biomed Res Int. 2013;1-5. Doi: 10.1155/2013/640682

4. Hörner M, Giglio VF, Santos AJRWAS, Westphalen AB, Iglesias BA, Martins PB, et al. Triazeno e atividade antibacteriana. Rev Bras Ciênc Farm. 2008;44(3):441-9.
5. Bonmassar L, Marchesi F, Pascale E, Franzese O, Margison GP, Bianchi A, et al. Triazene Compounds in the Treatment of acute Myeloid Leukemia: a Short Review and a Case report. Curr Med Chem. 2013;19:2389-401.
6. Moore DS, Robinson SD. Catenated nitrogen ligands part I. Transition metal derivatives of triazenes, tetrazenes, tetrazadienes, and pentazadienes. Adv Inorg Chem. 1986;30:1-68.
7. Domingues VO, Hörner R, Reetz LGB, Kuhn F, Coser VM, Rodrigues JN, et al. *In vitro* evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. J Braz Chem Soc. 2010;21(12):2226-37.
8. Shealy YF, Krauth CA, Pittillo RF, Hunt DE. A new antifungal and antibacterial agent, methyl 5(*or*4)-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4 (*or* 5)-carboxylate. J Pharm Sci. 1966;56(1):147-8.
9. Sreedhara A, Cowan JA. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. J Biol Inorg Chem. 2001;6(4):337-47.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart. CLSI document M07-A9. 9th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2012.
11. Yeo CY, Sim JH, Khoo CH, Goh ZJ, Ang KP, Cheah YK, et al. Pathogenic Gram-positive bacteria are highly sensitive to triphenylphosphane gold (O-alkylthiocarbamates), Ph₃PAu[SC(OR)=N(*p*-tolyl)] (R=Me, Et and *i*Pr). Gold Bull. 2013;46:145-52.
12. Barreiro E, Casas JS, Couce MD, Sánchez A, Seoane R, Estévez AP, et al. Synthesis and antimicrobial activities of gold(I) sulfanylcarboxylates. Gold Bull. 2012;45:23-34.
13. Wood JB, Smith DB, Baker EH, Brecher SM, Gupta K. Has the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Increased Trimethoprim-Sulfamethoxazole Use and Resistance?: a 10-Year Time Series Analysis. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(11):5655-60.
14. Sucena SF, Paivaa REF, Abbehausena C, Ives B, Mattos IB, Lancellotti M. Chemical, spectroscopic characterization, DFT studies and antibacterial activities *in vitro* of a new gold(I) complex with rimantadine. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2012;89:114-8.
15. Roymahapatra G, Mandal SM, Porto WF, Samanta T, Giri S, Dinda J, et al. Pyrazine functionalized Ag(I) and Au(I)-NHC complexes are potential antibacterial agents. Curr Med Chem. 2012;19(24):4184-93.
16. Bottone JE. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. Clin Microbiol Rev. 2010;23(2):382-92.

17. Conceição N, Darini ALC, Palazzo ICVP, Oliveira CCHB, Oliveira AG. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais State. Braz J Microbiol. 2010;41:34-6.

18. Abdou HE, Mohamed AA, Fackler JP, Burini A, Galassi RL, López-de-Luzuriaga JM, et al. Structures and properties of gold(I) complexes of interest in biochemical applications. Coord Chem Rev. 2009;253:1661-9.

Recibido: 21 de julio de 2014.

Aprobado: 28 de agosto de 2014.

Rosmari Hörner. Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS). Prédio 26, Sala 1201, Campus da UFSM, CEP: 97015-900. Telefax: (55) 3220-8751.
E-mail: rosmari.ufsm@gmail.com