

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

WANDERLEI BARBOSA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DERIVADOS AMINOGUANIDINAS HIDRAZONAS COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MIGRAÇÃO CELULAR *IN*
*VITRO***

MACEIÓ
2019

WANDERLEI BARBOSA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DERIVADOS AMINOGUANIDINAS HIDRAZONAS COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MIGRAÇÃO CELULAR *IN*
*VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR), da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Regina Célia Sales Santos

MACEIÓ
2019

**Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho**

S237a Santos, Wanderlei Barbosa dos.
Avaliação de derivados aminoguanidinas hidrazonas com potencial atividade antimicrobiana e migração celular *in vitro*/ Wanderlei Barbosa dos Santos. - 2019.
73 f. : il.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.

Co-orientadora: Regina Célia Sales Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 62-74.

1. Aminoguanidinas hidrazonas (Farmacologia). 2. Anti-infecciosos. 3. Sobrevivência celular. 4. Movimento celular - Técnicas *in vitro*. 5. Cicatrização.
I. Título.


CDU: 615.37

Folha de Aprovação

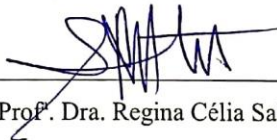
WANDERLEI BARBOSA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DE DERIVADOS AMINOGUANIDINAS HIDRAZONAS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR), da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.



Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, UFAL.

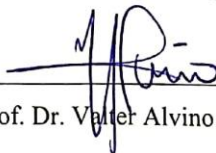


Coorientadora: Prof. Dra. Regina Célia Sales Santos, UFAL

Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Moreira, UFAL.



Prof. Dr. Valter Alvino da Silva, UFAL .

Aprovado em: 09 / 04 / 2019.

Em primeiro lugar a Deus por me permitir a oportunidade
de concluir esta etapa da minha vida.
Aos meus pais e amigos por todo apoio e confiança
depositados em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que sempre esteve e estará presente em minha vida, para me ajudar na árdua caminhada e mostrando que sempre posso alcançar meus objetivos.

Aos meus pais José Roberto e Dione pelo apoio e compreensão nesses anos de estudo, e por sempre me estimular a continuar nessa trajetória que escolhi para minha vida.

As minhas avós Josefa e Rosita e ao meu vô José Barbosa por serem o exemplo de vida, na qual me espelho todos os dias.

Ao meu orientador Prof^o Dr. João Xavier de Araújo Junior, pela oportunidade em me orientar em uma área da pesquisa acadêmica totalmente nova para mim, e pela atenção em alguns momentos de aflição.

A Prof^a Dr^a Regina Célia Sales Santos pela coorientação nessa fase da minha vida, mas também por todos esses anos de pesquisa que desenvolvemos, desde 2012 que caminhamos na pesquisa e hoje suas orientações me proporcionou ser uma pessoa melhor e por incentivar o meu crescimento enquanto futuro profissional e pesquisador.

A minha prima Maria Luciane que esteve comigo desde o início da caminhada do mestrado, ouvindo e aconselhando nos momentos de angústias pessoais e acadêmicas.

Ao meu amigo/irmão Enfermeiro Mestre Jeferson Caetano pelo companheirismo nos momentos difíceis e pelo incentivo nesses anos de amizade, acompanhando de perto o crescimento profissional um do outro.

A enfermeira Lucianna Costa por compartilhar e acompanhar de perto as aflições que passamos juntos e ter se tornando uma pessoa amiga não apenas na academia mas também na vida pessoal.

A Psicóloga e Mestre Sandra Maria que sempre me aconselhou e esteve presente nessa trajetória acadêmica.

A farmacêutica Érica Rodrigues pela disponibilidade em me ajudar nas horas que sempre precisei e por ouvir e aconselhar em determinados momentos. E aos colaboradores do Laboratório de Química Medicinal, obrigado a todos.

A enfermeira Mestra Gabriella de Araújo pelo carinho, disponibilidade e incentivo na vida acadêmica, pessoal e profissional, me ajudando em momentos de angústia as vésperas da defesa. E a Enfermeira Mestra Leticia Lopes pelo apoio na reta final do mestrado, obrigado.

Ao Dr. Edeildo Ferreira pela disponibilidade em ajudar mesmo a distância sempre que possível respondia aos meus e-mails.

As odontólogas Lilian Maria e Izadora Quintela e a farmacêutica Amanda Barbosa pelos incentivos e momentos de aflição que passamos juntos nesses últimos dois anos, aprendemos muito uns com os outros, e criamos um laço de amizade para além da UFAL.

Agradeço também aos laboratórios parceiros, que proporcionaram a realização dos testes desta pesquisa, Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) ESENFAR/UFAL, Laboratório de Química Medicinal (LQM) ESENFAR/UFAL, ao Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS/UFAL).

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo incentivo a pesquisa.

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito”.

“Não sou o que deveria ser, mas não sou o que eu era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

As Aminoguanidinas tem sido de interesse nos últimos 50 anos devido suas propriedades biológicas e químicas. Os derivados das aminoguanidinas hidrazonas representam uma classe de compostos que contêm um grupo amidina (guanil), ligado a uma porção hidrazona. Além disso, apresentam atividade biológicas tais como, anti-diabética, antimalária, Leishmanicida, antifúngica, antibacteriana e anti-HIV. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar os derivados aminoguanidinas hidrazonas com potencial atividade antimicrobiana e migração celular *in vitro*. Trata-se de uma pesquisa do tipo experimental *in vitro* de abordagem quantitativa e qualitativa. Foram utilizados 18 derivados de aminoguanidinas hidrazonas sendo submetidos ao ensaio para avaliar a atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas. A viabilidade celular foi avaliada por meio do método colorimétrico Metiltetrazolium com linhagens celulares de fibroblastos 3T3 nas concentrações de 10 e 100 μM e o teste de migração celular *in vitro* pela técnica de *scratch assay* utilizou a concentração de 10 μM . Evidenciou-se na atividade antimicrobiana que o LQM 131 apresentou uma CIM de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para a bactéria *Shigella flexneri*, e para o LQM 199 a inibição foi nas concentrações de 5 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri*. Em relação ao ensaio de viabilidade celular foi observado que na concentração de 10 μM todas as substâncias apresentaram viabilidade superior a 80%, no entanto, na maior concentração de 100 μM apenas quatro substâncias (LQM 96, 97, 101 e 131) mantiveram-se viáveis com percentual acima de 80%, as demais apresentaram relevante toxicidade para as linhagens de fibroblastos. Na avaliação da migração celular, observou-se que as substâncias LQM 101, 131, 134 e 195 apresentaram-se de forma semelhante quando comparado ao controle positivo (55,17%), com percentuais de migração de 55,01%, 56,98%, 58,13% e 57,95%, respectivamente, e a substância LQM 132 apresentou diminuição da migração dos fibroblastos com percentual de 23,31%. Contudo, conclui-se que as aminoguanidinas hidrazonas apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas testadas, sendo as substâncias LQM 106, 131, 198 e 199 com inibição frente às seis bactérias testadas. As substâncias mantiveram viabilidade celular superior a 80% na concentração de 10 μM e na concentração de 100 μM apenas quatro moléculas mantiveram a viabilidade superior a 80%. Não foi observada migração celular dos fibroblastos 3T3 quando tratados com as aminoguanidinas hidrazonas.

Palavras - chave: Aminoguanidinas hidrazonas. Antimicrobianos. Viabilidade celular. Migração celular *in vitro*.

ABSTRACT

Aminoguanidines have been of interest in the last 50 years because of their biological and chemical properties. Derivatives of the aminoguanidines hydrazones represent a class of compounds which contain an amidine group (guanyl), attached to a hydrazone moiety. Moreover, present biological activities such as anti-diabetic, antimalarial, antileishmanial, antifungal, antibacterial and anti-HIV. Thus, the aim of this study is to evaluate the derivatives aminoguanidine hydrazones with potential antimicrobial activity and cell migration in vitro. It is an in vitro experimental research with quantitative and qualitative approach. Eighteen hydrazone aminoguanidine derivatives were tested and evaluated for antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. Cell viability was evaluated by Methyltetrazolium colorimetric method with cell lines of 3T3 fibroblasts at concentrations of 10 and 100 μM and test in vitro cell migration by the scratch assay technique used concentration of 10 μM . The antimicrobial activity of LQM 131 showed a MIC of 12,5 $\mu\text{g/mL}$ for *Shigella flexneri*, and for LQM 199 the inhibition was at concentrations of 5 to 12,5 $\mu\text{g/mL}$ against strains *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* and *Shigella flexneri*. In relation to cell viability assay, it was observed that in the 10 μM concentration all the substances showed viability higher than 80%, however, in the highest concentration of 100 μM only four substances (LQM 96, 97, 101 and 131) remained viable with a percentage above 80%, the others presented relevant toxicity to the fibroblast lineages. In the evaluation of cellular migration, it was observed that LQM substances 101, 131, 134 and 195 presented a similar form when compared to positive control (55.17%), with percentages of migration of 55,01%, 56,98%, 58,13% and 57,95%, respectively, and LQM 132 showed decreased fibroblast migration with a percentage of 23,31%. However, it was concluded that the aminoguanidines hydrazones showed antimicrobial activity against the tested strains, being LQM substances 106, 131, 198 and 199 with inhibition against the six bacteria tested. The substances maintained cell viability greater than 80% at the 10 μM concentration and at the concentration of 100 μM only four molecules maintained viability greater than 80%. No cellular migration of 3T3 fibroblasts was observed when treated with the aminoguanidines hydrazones.

Keywords: Aminoguanidines hydrazones. Antimicrobials. Cell viability. *In vitro* cell migration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático da síntese das novas aminoguanidinas hidrazonas.	16
Figura 2 - Diferença da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas.	19
Figura 3 - Mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias.	20
Figura 4 - Estrutura fisiológica da pele.	24
Figura 5 - Estrutura química da aminoguanidinas.	30
Figura 6 - Estrutura química da aminoguanidinas hidrazona.	30
Figura 7 – Aminoguanidinas hidrazonas com propriedades antitumorais.	31
Figura 8 - Guanilhidrazonas com atividade tripanossomicida.	32
Figura 9 - Rota sintética das substâncias aminoguanidinas hidrazonas.	35
Figura 10 - Reação de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium para formazam.	37
Figura 11 - Técnica de arranhadura (Scratch assay) dos fibroblastos 3T3.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas químicas das aminoguanidinas hidrazonas.	41
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima das substâncias LQMs sobre as bactérias Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	44
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima das substâncias LQMs frente as cepas bacterianas Gram-negativas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> e a <i>Shigella flexneri</i>	47
Tabela 4 - Comparação dos dados das substâncias LQM 17 com o LQM 199 para as frente às cepas bacterianas Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> e Gram-negativas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a <i>Escherichia coli</i>	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Viabilidade celular das substâncias aminoguanidinas hidrazonas na concentração de 10 μ M e 100 μ M.	56
Gráfico 2 - Migração celular das substâncias aminoguanidinas hidrazonas na concentração de 10 μ M.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Cell Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDK1	Quinase dependente de ciclina 1
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CI50	Concentração letal capaz de matar 50% da população
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EtOH	Etanol
IL-8	Interleucina 8
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular 1
LFb	Fator de fibroblastos básico
LQM	Laboratório de Química Medicinal
μ g	Micrograma
MEC	Matriz extracelular
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NH ₂	Aminas
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio
PMSI COM	Programa de medicalização do sistema de informação de medicina, cirurgia e obstetrícia.
RSK2	Quinase S6 ribossômica 2
TGF β	Fator de transformação do crescimento beta
TTC	Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Resistência bacteriana	17
2.2 Cicatrização de feridas	23
2.3.1 Migração celular <i>in vitro</i>	28
2.1 Aminoguanidinas hidrazonas	29
3 OBJETIVO GERAL	33
3.1 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Locais do estudo	34
4.2 Síntese dos derivados Aminoguanidinas hidrazonas	34
4.3 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	35
4.3.1 Microrganismos utilizados	35
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da Microdiluição em Caldo.....	35
4.3.3.1 Cálculo da inibição microbiana	37
4.3.4 Ensaio de viabilidade celular por meio do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)	38
4.3.5 Ensaio da migração celular <i>in vitro</i> (<i>Scratch Assay</i>).....	39
4.3.6 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Síntese das substâncias aminoguanidinas hidrazonas	41
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da Microdiluição em Caldo	43
5.3 Ensaio de viabilidade celular por meio do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)	55
5.4 Ensaio da migração celular <i>in vitro</i> (<i>Scratch Assay</i>)	57
6 CONCLUSÃO	60
7 PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

As substâncias sintéticas são utilizadas pela população há alguns anos, e desde a revolução industrial foram impulsionados incentivos nesta área. Dentre os compostos sintéticos as aminoguanidinas tem recebido considerável interesse de pesquisadores nos últimos 50 anos na química e por apresentarem amplas atividades farmacológicas (AGRAWAL et al., 1974; WEI et al., 2016). São muito estudadas em experimentos com animais de pequeno porte, para o tratamento do diabetes e nas consequências provenientes desta patologia, como a retinopatia e lesões tissulares cutâneas, além de diminuir os níveis glicêmicos dos animais (HAMMES et al., 1991; TIAN et al., 2016).

Quimicamente as aminoguanidinas são moléculas utilizadas como intermediárias na síntese de compostos heterocíclicos, por apresentar em sua estrutura átomos de nitrogênio (GOSSNITZER; FEILER; WAGNER, 2002). A parte guanidina presente nestas substâncias apresenta uma forte basicidade, além disso, esta faz parte da composição de muitos compostos biologicamente ativos (ORNER; HAMILTON, 2001).

As aminoguanidinas hidrazonas ou guanilidrazonas apresentam as características receptoras e doadoras de ligações de hidrogênio, estando também aptas a desenvolver interações eletrostáticas (SCHMIDTCHEN; BERGER 1997; LANGE et al., 2003; FRANÇA 2016). A síntese destas substâncias consiste na reação de condensação de uma carbonila e uma amina, que é realizada sob refluxo com solvente etanol ou metanol, sendo uma reação simples do ponto de vista sintético (MARTINS et al., 2004; AQUINO, 2016).

Dentre os grupos de estudo que trabalham com a síntese e a atividade biológica de substâncias sintéticas, o Laboratório de Química Medicinal (LQM) desenvolve pesquisas com a síntese e modificação estrutural de substâncias. O estudo pioneiro para este laboratório foi realizado na pesquisa de Epifânio (2011) que sintetizou vinte substâncias de derivados aminoguanidinas hidrazonas que foram apresentadas pela sigla LQM 1 a 20, e estas foram avaliadas como protótipos de fármacos antineoplásicos, em que apresentaram resultados promissores frente a três linhagens de células cancerígenas.

As substâncias supracitadas apresentaram atividade leishmanicida em testes *in vitro* com as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, tendo resultados similares ao fármaco padrão pentamina utilizado no teste (FRANÇA, 2014).

Outras atividades biológicas foram avaliadas como a propriedade antidiabética e inibidora de produtos finais da glicação avançada, sendo realizado o teste *in vitro* antiglicante com as 19 substâncias aminoguanidinas hidrazonas e as com melhores resultados (LQM 3,

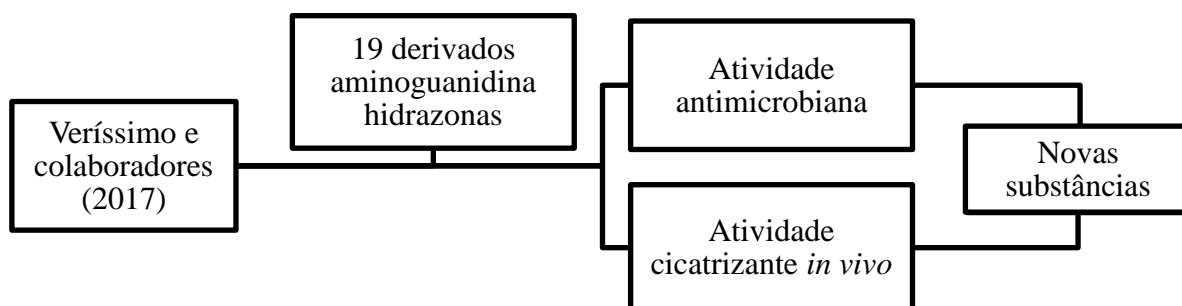
LQM 13 e LQM 15) foram selecionadas para os testes *in vivo*, estas apresentaram redução dos níveis glicêmicos em até 65% sem causar toxicidade nos animais (SARMENTO et al., 2016).

A atividade antimicrobiana foi avaliada com as 19 substâncias de aminoguanidinas hidrazonas, em que foram selecionadas as quatro melhores substâncias para estudos com animais, sendo avaliada a atividade antisséptica com soluções contendo as substâncias LQM 3, LQM 10, LQM 15 e LQM 17 e foram testadas em ratos para verificar o tempo inibição do antisséptico, os produtos apresentaram-se promissores pois mantiveram um amplo espectro de ação, baixa toxicidade e poderiam ser utilizado em pele integra ou mucosa (BERNADO et al., 2017).

Na pesquisa realizada por Veríssimo e colaboradores (2017) provenientes do Laboratório de Química Medicinal, foram utilizadas as 19 substâncias aminoguanidinas hidrazonas para avaliação antimicrobiana e citotóxica, após os testes *in vitro* foram selecionadas as substâncias LQM 03, LQM 10, LQM 14, LQM 17 e LQM 20 para uma composição farmacêutica (creme) para avaliação da cicatrização de feridas infectadas. Foi observado que houve uma redução no tempo da cicatrização das feridas de dois dias quando comparado os grupo controle positivo da pesquisa. Outro estudo com estas moléculas avaliou a atividade moduladora da ação antimicrobiana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (DANTAS et al., 2018).

Desta forma, observa-se que esta classe de 19 substâncias apresentaram atividades biológicas promissoras, tais como, leishmanicida, antiglicantes, antitumoral, antimicrobiana e cicatrizante. Com base nas pesquisas citadas acima, as substâncias passaram por modificações estruturais e surgiram novas moléculas (Figura 1). Com isto, justifica-se nesta pesquisa testar estas novas substâncias avaliando as atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro*, com o intuito de explorar as atividades biológicas das novas aminoguanidinas hidrazonas.

Figura 1 - Desenho esquemático da síntese das novas aminoguanidinas hidrazonas.



Fonte: Autor, 2019.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência bacteriana

As doenças provenientes de processos infecciosos acometem as populações desde os primórdios causando a morte de milhares de pessoas durante muitos anos, com a falta de tecnologias adequadas para o devido conhecimento da etiologia dessas enfermidades não era possível criar estratégias de prevenção, cura e combate das patologias (FUZETA, 2017).

O início de século XX foi marcado pela revolução da descoberta dos antibióticos, em um contexto marcado por diversas enfermidades infecciosas sem tratamento adequado. Ressalta-se a importância das pesquisas realizadas por Alexander Fleming que em 1928, descobriu em uma contaminação por fungo em suas culturas bacterianas, uma inibição dos microrganismos, causadas por substâncias produzidas pelo fungo *Penicillium notatum*, no qual Fleming chamou de penicilina (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2012; LIA, 2014).

A repercussão para esta descoberta proporcionou a prevenção de milhares de mortes que ocorriam nesse período, tendo em vista que não existia uma forma eficaz para o controle bacteriano (CAVALCANTE; ANJOS; VANDESMET, 2016). Além disto, os benéficos para saúde pública foram relevantes, pois os custos hospitalares consequentemente diminuíram e os pacientes tiveram melhor qualidade na assistência de suas enfermidades bacterianas (PEREIRA; PITA, 2005).

Após a descoberta de Fleming, foi possível produzir a penicilina em escala industrial, este feito se deve às pesquisas realizadas por Howard Florey e Ernst Boris Chain, no qual haviam desenvolvidos técnicas de purificação de substâncias. Com isto, em 1944 foram tratados vários soldados provenientes das forças aliadas com ferimentos dos conflitos ocorridos na época (TAGLIABUE; RAPPUOLI, 2018). De forma geral, Observou-se a época uma diminuição nos índices de morbimortalidade, decaindo para 4% das doenças causadas por bactérias (KARDOS; DEMAIN, 2011). No ano seguinte, os três pesquisadores ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina (TAGLIABUE; RAPPUOLI, 2018).

O século XX foi marcado pelo desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos tendo como referência, por exemplo, a penicilina, incentivando novas pesquisas para explorar outras classes a partir deste. Contudo, foram sendo observados que algumas cepas de bactérias não eram sensíveis à quimioterapia bacteriana disponível, por mecanismos ainda desconhecidos à época (CHOPRA; HESSE; O'NEILL, 2002).

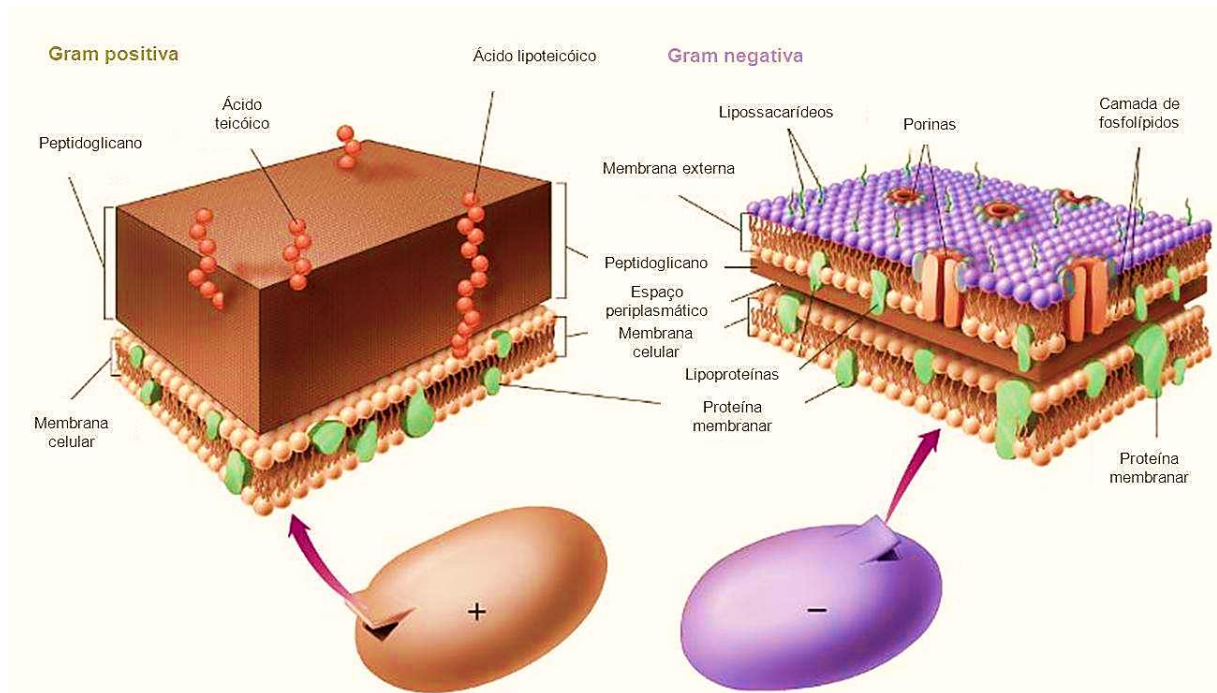
A resistência microbiana foi detectada com a descoberta da penicilina, Fleming foi um dos primeiros a observar que algumas cepas não eram sensíveis após a exposição ao antibiótico, contudo, não foi considerado relevante naquele momento como um problema preocupante (AMINOV, 2010; CAVALCANTE; ANJOS; VANDESMET, 2016). O avanço das pesquisas na busca de novas substâncias trouxe para humanidade a oportunidade na eliminação desses patógenos, porém, a utilização de forma demasiada desses agentes antimicrobianos foi conferindo as bactérias ao longo do tempo mecanismos de resistência cada vez mais eficaz (GOULD, 2016).

Atualmente, é de suma importância conhecer a diferença morfológica das bactérias Gram positivas e negativas e quais os mecanismos de resistência bacteriana para uma escolha adequada da terapêutica, tendo em vista que a utilização dos fármacos ocorre de forma irracional pelos pacientes e por prescrições em alguns casos sem a devida comprovação da espécie envolvida no processo infeccioso, além disso, a exposição das bactérias a diversos agentes na área hospitalar também é uma das causas preocupantes para os órgãos de saúde pública (FRANCO et al., 2015).

A resistência microbiana esta relacionada a algumas características presentes nas bactérias, como por exemplo, a estrutura da parede celular que difere em bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os microrganismos bacterianos Gram positivos apresentam uma parede celular espessa (20-80 nm), composto por peptidoglicana que estão presentes os ácidos teicóicos e lipoteicóico, além de proteínas que ficam ancoradas na membrana plasmática (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007).

Em relação às bactérias Gram negativas a parede celular possui uma camada fina (<10 nm), porém, apresenta uma membrana externa que estão aderidos os lipopolissacarídeos e as porinas, no espaço periplasmático encontram-se as lipoproteínas e os peptidoglicana, seguida da membrana citoplasmáticas (Figura 2). Este arcabouço bacteriano torna as bactérias Gram negativas mais complexas quando comparadas com as Gram positivas, além disso, conferem diferentes propriedades a bactéria em particular resposta a tensões externas, tais como, calor, radiação UV e antibióticos (VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007; MAI-PROCHNOW et al., 2016).

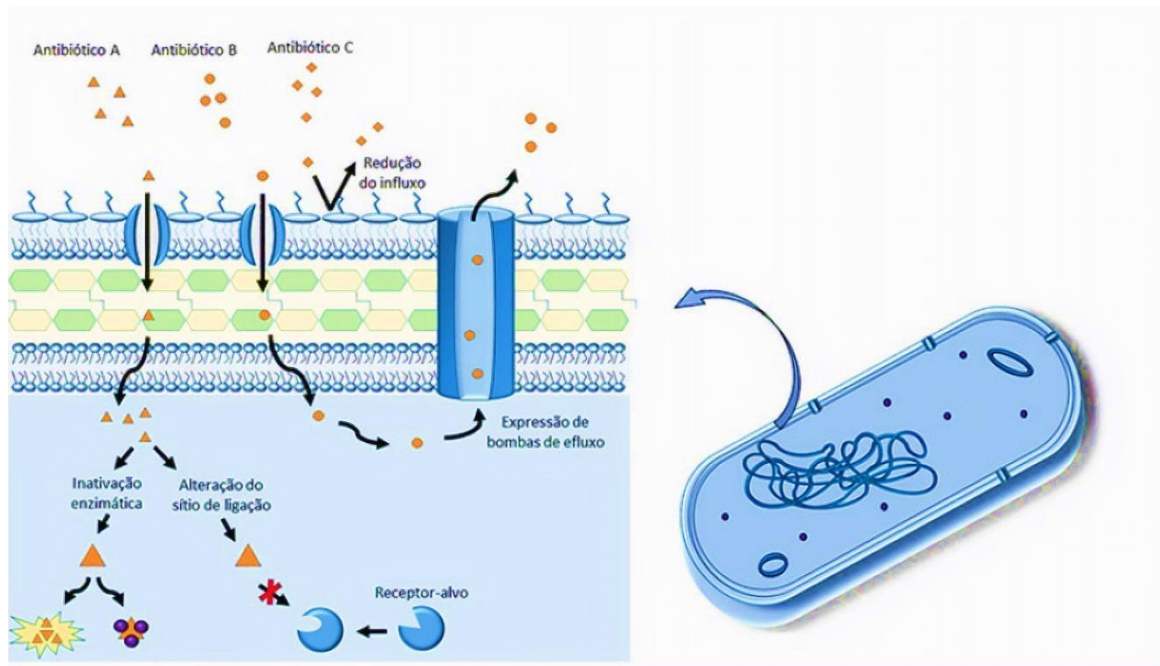
Figura 2 - Diferença da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas.



Fonte: MICROBIOLOGY INFOR, 2019.

Alguns mecanismos de resistência são citados na literatura, e de acordo com Costa e Silva Junior (2017) pode-se mencionar a inativação enzimática do fármaco, alteração do sítio alvo do antibiótico, bombas de efluxo, modificação da permeabilidade da membrana e desenvolvimento de biofilmes (Figura 3), estas são as principais adaptações de defesas das bactérias quando expostas as classes de antimicrobianos.

Figura 3 - Mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias.



Fonte: NOGUEIRA et al., 2016.

A inativação enzimática é uma das principais formas de resistência, no qual, os microrganismos sintetizam enzimas que vão causar a inativação, o bloqueio ou modificação na estrutura química do antibiótico, causando a inibição de seus efeitos terapêuticos (HUANG et al., 2017). Um exemplo muito conhecido desse mecanismo são as beta lactamases, essas enzimas produzidas por algumas estirpes bacterianas, no qual, quebram o anel beta-lactâmico que fazem parte da estrutura química das penicilinas, causando a perda do efeito biológico do fármaco (PUTAROV; GALENDE, 2011)

Outra forma evolutiva para resistir aos fármacos, ocorre por meio da alteração do sítio de ligação do antibiótico, em que observa-se modificações neste alvo, sem obrigatoriamente ter interferência na aptidão bacteriana, porém com pequenas alterações para compensar as novas características. Por exemplo, quando acontece variações no RNA polimerase ou na DNA girase, as bactérias apresentam resistência aos antibióticos como as rifamicinas e quinolonas, respectivamente (LAMBERT, 2005; WRIGHT, 2011).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas de bactérias Gram positivas e negativas, sua função é transportar uma substância do meio intracelular para o extracelular, isto ocorre devido ao aumento da expressão das bombas de efluxo ou a proteína expressa uma substituição de aminoácidos conferindo a cepa uma maior eficiência na extração do antibiótico. Este mecanismo pode ocorrer de forma específica para um substrato

ou agir de forma multivariada para várias classes de fármacos antimicrobianos (BLAIR et al., 2015).

Neste contexto, ressalta-se que essa estratégia bacteriana não está associada obrigatoriamente à resistência à classe de fármaco ou da concentração terapêutica, mas a resistência mediada pela potência da espécie no efluxo dessas substâncias (PIDDOCK, 2006).

A permeabilidade da membrana bacteriana é essencial para as interações com os antibióticos, pois nas bactérias Gram negativas esta é composta por uma bicamada composta por fosfolipídios e lipídios, além de algumas porinas. Alterações na quantidade ou tamanho das porinas e na hidrofobicidade conferem as cepas resistências aos fármacos, como os β -lactâmicos que por ser hidrofílico penetram nas células por meio dos poros, e os macrolídeos por serem hidrofóbicos atravessam a bicamada lipídica (DECLOUR, 2009; MUNITA; ARIAS, 2016).

Outra forma de resistir aos antibióticos criados pelos microrganismos é a síntese dos biofilmes, no qual os organismos produzem uma matriz para aderência nas superfícies e é formada uma barreira de proteção contra os agentes nocivos (CAUMO et al., 2010). A matriz é composta por substâncias poliméricas extracelulares, que são constituídos por lipídios, proteínas, polissacarídeos, entre outros, e confere um agregado e a comunicação entre as bactérias (KARATAN; WATNIK, 2009).

Com a evolução dos mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias, na atualidade reflete-se uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, e de acordo com Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (2013) estes microrganismos resistentes causam mais de 2 milhões de infecções, no qual acarreta em média 23.000 óbitos anualmente nos Estados Unidos (EUA). Estima-se que as infecções bacterianas acometerão mais de 10 milhões de mortes mundialmente até 2050, segundo relatório no Reino Unido, estes dados mostram a necessidade de se implantarem medidas de prevenção e novas estratégias para o controle microbiano em nível mundial (SEPTIMUS, 2018).

Na França foi registrado mais de 1 milhão de pacientes acometidos por doenças bacterianas, apresentadas pela base de dados nacional do Programa de medicalização do sistema de informação de medicina, cirurgia e obstetrícia (PMSI COM) de 2014, evidenciando uma média de 6 dias de internações nos hospitais públicos ou privados do país, destas 7% corresponderam a infecções resistentes (LÉOTOING et al., 2018).

Estudo realizado em hospitais comunitários e universitários do Líbano mostrou que 55% dos pacientes apresentaram infecções nosocomiais, destes os clientes que eram provenientes do ambiente hospitalar universitários apresentaram maiores índices de

resistência bacteriana quando comparados com os adquiridos nas comunidades (MATTA et al., 2018).

No Brasil, o controle das infecções é realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no qual publicou em 2016 no Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde os índices das notificações de infecções primárias de corrente sanguínea com 22.499 casos provenientes de unidades de terapia intensiva de todo o país (BRASIL, 2016). Evidencia-se que as infecções de pós-operatório dos serviços de saúde país correspondem a 14 a 16% dos pacientes submetidos a cirurgias (BRASIL, 2009).

Pesquisas realizadas em hospitais mostram que os principais sítios de infecções são o trato respiratório inferior, sistema genito-urinário, trato gastrointestinal e infecção da corrente sanguínea (RATTANAUMPAWAN; THAMLIKITKUL, 2017), pele e infecções de tecidos moles, infecções cardíacas, ósseas e articulares, dentre outras, essas informações mostram a necessidade da vigilância das medidas preventivas básicas para minimizar essas morbidades (LÉOTOING et al., 2018).

Essas enfermidades causam danos para os pacientes, pois aumenta o tempo de permanência nos hospitais, podem levar a danos psicológicos, tendo em vista que em alguns casos os clientes ficam afastados do seu convívio social e estão em exposição a outros agentes infecciosos do ambiente hospitalar que de modo geral apresentam algum tipo de resistência, deixando estes vulneráveis a outras infecções ou mesmo ao óbito (KAYE et al., 2014).

Além disto, os dispêndios gerais para o sistema de saúde são crescentes, nos EUA estima-se que em 2015 foram gastos uma média de 3,2 trilhões de dólares nesse setor, com impacto de 17,6% do produto interno bruto (SCHUMOCK et al., 2015). É complexo determinar a relação dos custos provenientes da resistência bacteriana, mas a estimativa é que sejam mais de \$20 bilhões dos gastos nos cuidados de saúde diretamente associados e que podem levar quase duas vezes esse valor na perda da produtividade (ROBERTS et al., 2009; CDC, 2013).

Muitas espécies bacterianas estão envolvidas nos processos infecciosos, a intensidade deste depende de alguns fatores intrínsecos e extrínsecos dessas cepas, tais como, a patogenicidade, fatores de virulência (fímbrias, produção de endotoxinas), adesão bacteriana nas células, além disso, para um ambiente propício à multiplicação dessas estirpes os hospedeiros apresentam imunidade baixa (VIEIRA, 2009).

De modo geral, as bactérias presentes nas infecções dependerão do tipo de patologia que acomete o órgão ou do ambiente propício para o microrganismo, por exemplo, nos casos de infecções do trato urinário inferior, foi realizado um estudo recente que mostrou por meio

de urocultura que as cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. foram as principais causadoras desta infecção (FERREIRA et al., 2017).

Nas lesões tissulares provocadas ou agravadas por processo infeccioso bacteriano pode-se encontrar a celulite, erisipela, foliculite, furúnculo, abscesso e impetigo, esses casos em geral apresentam doenças associadas que retardam a recuperação no tecido afetado (KAYE et al., 2015; PIRES et al., 2015). Algumas feridas ocasionadas por queimaduras estão propensas à infecção devido à exposição das camadas da pele e ao próprio ambiente hospitalar que podem ficar expostas a diversas cepas bacterianas resistentes (LACHIEWICZ et al., 2017).

De acordo com Santos et al. (2016) as principais bactérias que acometem as infecções de sítio cirúrgico são *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Morganella morganii*, *coliformes* e *Bacteroides* spp., que podem levar a consequências como as deiscência cirúrgicas das feridas, sendo encontrados também em feridas diabéticas e nas causadas por traumas (KASSAM et al., 2017).

Neste contexto supracitado, com a evolução dos mecanismos de resistência bacteriana e as morbidades causadas por estas, atualmente observa-se a necessidade de novas substâncias para substituir ou complementar os antibióticos utilizados nas terapêuticas, que apresentam propriedades químicas seguras e apropriadas, evitando-se interações indesejadas (HAQUE et al., 2018).

Estudos recentes evidenciam que a atividade biológica apresentada por uma substância está relacionada com sua estrutura molecular, e alterações nesta podem potencializar ou diminuir essas propriedades (MEDEIROS et al., 2017). Desta forma ressalta-se a importância de se pesquisar novas substâncias com modificações estruturais que apresentem atividades antimicrobianas.

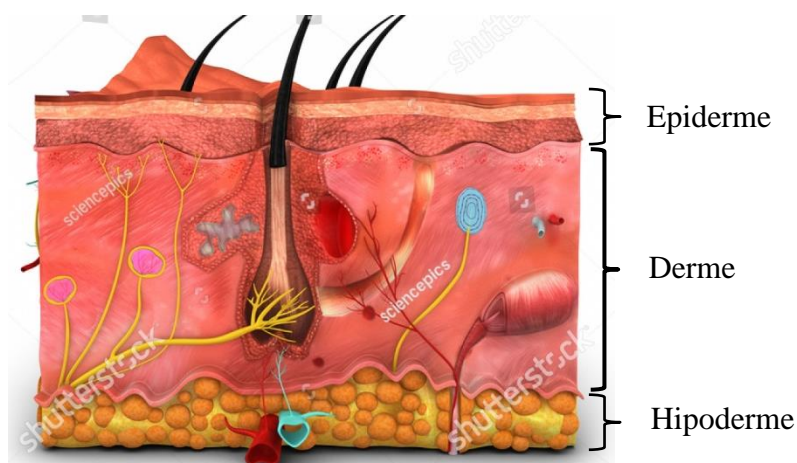
2.2 Cicatrização de feridas

A pele constitui o maior órgão do corpo humano, esta pode representar até 15% do peso total, que pode exercer várias funções como a de revestir o organismo isolando os órgãos internos do ambiente externo. Desta forma, apresenta uma complexidade estrutural de tecidos, no qual tem a finalidade de proteção, termorregulação, percepção e secreção, entre outras,

assim desenvolveu meios para remodelação adaptando-se às condições ambientais e de reparação quando lesionada (EVANS et al., 2013).

Este órgão é constituído histologicamente por três camadas sendo a epiderme que recobre superficialmente a pele; a derme é intermediária, sendo composta por tecido conjuntivo e encontram-se as terminações nervosas, glândulas e tipos celulares presentes na pele; e a hipoderme ou tecido celular subcutâneo é a porção mais profunda da pele (Figura 4) (PORTO, 2014).

Figura 4 - Estrutura fisiológica da pele.



Fonte: Shutterstock, 2018.

Assim como os demais sistemas humano, a pele pode sofrer alterações provenientes de fatores etiológicos intrínsecos e extrínsecos, no qual desencadeiam transformações na homeostase da pele, tendo como consequência, o surgimento das feridas cutâneas, levando a incapacidade funcional (DUARTE; ALVES, 2013).

A ferida ocorre por uma lesão física no corpo proveniente de uma solução de continuidade, este traumatismo promove consequências nas morfologias cutâneas superficiais e nas subjacentes do tecido (HUSSEIN et al. 2011). Muitas causas podem levar a etiologia das lesões tissulares podendo estar associada a vários fatores como traumatismos, queimaduras, úlceras por pressão, úlceras por estase venosa, lesões em pés diabéticos e feridas por radioterapia, estes são os fatores que mais acometem os indivíduos (MALAQUIAS et al., 2014)

De acordo com dados dos custos hospitalares provenientes dos portadores de feridas, em média 4,5 bilhões de dólares anuais foram destinados para terapêuticas com os pacientes com lesões tissulares nos Estados Unidos no ano de 2009 (KAYE et al., 2015). Nota-se que a

incidência das feridas no mundo foi de aproximadamente 8,5 milhões de indivíduos, em se tratando das lesões por pressão, e também em torno de 12,5 milhões de úlceras venosas e 13,5 milhões de feridas diabéticas serão destinadas para terapêutica clínica (LAWALL, 2012).

Quando o indivíduo é acometido por uma lesão tissular ocorre o fenômeno da cicatrização, este é um processo complexo que compõe na sistematização das células, mediadores químicos e produção de matriz extracelular, proliferação de células parenquimatosas, no qual o intuito é a recuperação do tecido acometido pela injúria (SANTOS et al., 2012; GONZALEZ et al., 2016).

Para compreender o processo fisiológico da cicatrização das feridas, pode-se classificar esse fenômeno em feridas de espessura parcial, no qual a epiderme e parte da derme são atingidas, assim como os folículos capilares e as glândulas sudoríparas, e as feridas de espessura total, sendo este comprometimento de toda epiderme, derme e tecido subcutâneo, que pode atingir o tecido muscular e ósseo (MEIRELES; SILVA, 2011).

Os dois processos de cicatrização supracitados ocorrem de formas diferentes nas lesões tissulares, e nas feridas de espessura parcial a regeneração transcorre pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele que foi atingida. Esse processamento é finalizado com uma cicatriz imperceptível (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Não obstante, nos ferimentos de espessura total esse processo torna-se mais complexo, tendo em vista que requer a reparação de um novo tecido de granulação, epitelização e contração das lesões ocorrendo desta forma o reparo completo da ferida (MEIRELES; SILVA, 2011). Para compreender o processo de cicatrização de forma didática este foi dividido em quatro fases onde estão interligadas e sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação do tecido. Essa sequência deve seguir a ordem cronológica, por um determinado tempo e período de tempo ideal (GOSAIN; DIPIETRO, 2004; PESSANHA; OLIVEIRA, 2015).

Iniciada a lesão tissular, dar-se início a fase de hemostasia, mecanismo fisiológico que ocorre como um reflexo de emergência biológica, acontecendo minutos após a lesão aguda no qual é proporcionado o disseminação de sangue, preenchendo o local da solução de continuidade com plasma e elementos celulares, especialmente plaquetas (BERGER et al., 2014).

O acontecimento da agregação plaquetária e formação do coágulo proporcionam a liberação de agentes quimiotáticos como o fator de transformação do crescimento beta (TGF β), além de alguns tipos de aminas, que contribuirá na cascata da cicatrização,

estimulando outros tipos celulares que potencializaram a fase seguinte da cicatrização (VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009; DANCKWARDT; HENTZE; KULOZIK, 2013).

Os fenômenos que ocorrem durante a hemóstase contribuem para uma resposta efetiva na fase da inflamação, na qual esta etapa caracteriza-se pelo recrutamento de células para a área da ferida, com o propósito de eliminar agentes infecciosos e restos celulares. Além disso, são observados os sinais cardinais da inflamação, incluindo edema, calor, rubor, dor e perda da sensibilidade em alguns casos dependendo da local afetado. Esses acontecimentos duram em média 24 e 48 horas e podendo persistir por até duas semanas (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Muitos são os tipos celulares envolvidos nessa fase, e as células que primeiro chegam à região são os neutrófilos seguidos dos monócitos, por ação da quimiotaxia, essa resposta é exercida por ação das quimiocinas liberadas durante a fase de hemóstase e pelos mastócitos (WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013). Como resultado da degradação dos monócitos, têm-se colágeno, a fibronectina e a trombina (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

Além disso, os macrófagos também são encontrados, este desempenha a função de lise e fagocitose, essas funções são explicadas pelo grande número de enzimas hidrolíticas, que confere aos macrófagos a capacidade em degradar diversos tipos de materiais, eliminando da lesão todo o produto solubilizado pelos neutrófilos, inclusive os neutrófilos mortos. Isto explica a importância dessas células na transição entre a inflamação e a fase proliferativa (MEIRELES; SILVA, 2011).

Consecutivamente a atividade dos leucócitos polimorfonucleares, começa então o estágio da proliferação, esta se caracteriza pela subdivisão em três subfases: a angiogênese, fibroplasia e a reepitelização (CÔRTEZ, 2013). Sendo esta fase determinada pelo surgimento do tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Com a perda da vascularização do leito da ferida, causa no tecido o sofrimento pela hipóxia, diminuição do potencial de hidrogênio (pH) e aumento do lactato, essa resposta promove o processo da angiogênese. O lactato estimula a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de fibroblastos básico (Lfb) e TGF β , além disso, as células endoteliais sintetizam enzimas que atuam na matriz extracelular (MEC), proporcionando fenestras onde os capilares podem formar uma nova rede, surgindo a formação das arteríolas, e com isso restabelecendo a vascularização (BELDON, 2010).

Concomitante os processo de angiogênese, ocorre a fibroplasia que atua na deposição e remodelação da MEC, isso acontece por ação dos fibroblastos, que possui a função de sintetizar colágeno, este é depositado na MEC com a função de constituir uma estrutura com suporte rígido, com o objetivo de sustentar a força da tensão produzida pela cicatriz (WILLIAMSON; HARDING, 2004).

Na reepitelização, os queratinócitos produzem enzimas que estimulam a proliferação das células epiteliais, estas migram a partir do leito para o centro da lesão, com o propósito de induzir a contração e formar novo tecido epitelial da ferida, desta forma, reduzindo a sua superfície (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Durante a fase da remodelagem, as fibras de colágeno do tipo III são substituídas para as de tipo I, que apresenta qualidade superior. Por conseguinte, ocorre a formação do tecido cicatrização e caracteriza-se com as transformações da forma, tamanho e resistência da cicatriz. Há ainda uma constante produção e degradação do colágeno, proporcionando uma organização em orientação linear, como lateral, isso acontece por um período relativamente longo de 12 a 15 meses, possibilitando que a cicatriz assemelhe-se ao tecido normal (MEIRELES; SILVA, 2011).

O processo de regeneração das lesões tissulares classifica-se a cicatrização em três tipos, por primeira intenção, no qual as bordas da ferida estão aproximadas e suturadas, são os casos das feridas cirúrgicas. Na cicatrização por segunda intenção, ocorre maior perda de tecido, esta demora a cicatrizar e ficam propensas às complicações como infecções, como exemplos tem-se deiscência de feridas pós-cirúrgica, e na cicatrização de terceira intenção ocorre quando a ferida é deixada aberta, por causa da presença de infecção, quando esse processo é debelado, as bordas das feridas são aproximadas e a cicatrização ocorre por meio da reepitelização (BELDON, 2010).

Alguns fatores são relevantes para que a cicatrização das lesões ocorra de forma efetiva, podem ser categorizado em locais, que dizem respeito àqueles que interferem nas características da ferida, sendo eles: oxigenação, infecção, corpo estranho e a suficiência venosa. Enquanto que nos fatores sistêmicos estão relacionados ao estado geral do indivíduo, e observa-se a idade, sexo, hormônios sexuais, estresse, isquemia, diabetes, obesidade, alcoolismo, tabagismo, imunocomprometidos e nutrição (LEAL; CARVALHO, 2014).

Neste contexto, o processo infeccioso é um dos fatores que influenciam diretamente na cura das lesões, pois os microrganismos que colonizam as feridas interferem nas fases da cicatrização, podendo prolongar a fase inflamatória, o período de epitelização, contração do leito da lesão, assim como na deposição de colágeno, além disso, de modo geral

microrganismos que se mostram em grau superior nas feridas são as bactérias quando comparado aos demais agentes patológicos, estas sintetizam endotoxinas contribuem para a destruição tissular (PAGGIARO; NETO; FERREIRA, 2010).

O mecanismo de resistência bacteriana no processo de cicatrização que têm restringido as opções dos antibióticos sintéticos utilizados nesta terapêutica, pois, estes não exercem suas funções de modo satisfatório, causando prejuízo para o indivíduo com feridas infectadas. Desta forma evidencia-se a necessidade em buscar novas alternativas para o tratamento dessas lesões (DAESCHLEIN et al., 2015).

2.3.1 Migração celular *in vitro*

O processo de cicatrização é caracterizado pelos diversos estágios no reparo tecidual para o seu equilíbrio. Essas respostas do organismo são reguladas por moléculas de sinalização e células presentes na matriz extracelular, que são acionadas após uma solução de continuidade no tecido (GONZALEZ et al., 2016).

Nesse processo ocorre a migração celular, na qual, estão envolvidos os neutrófilos, macrófagos, linfócitos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, entre outras. Essa migração promove o reparo e regeneração dos tecidos. Atualmente, alguns testes são realizados com esses tipos celulares em modelos *in vitro* para avaliação do potencial de novas substâncias como agente cicatrizante, dentre os ensaios pode-se mencionar a câmara de boyden, stopper-based e scratch ou wound healing (GOETSCH; NIESLER, 2011; PLANZ; WANG; WINDBERGS, 2018).

O scratch é uma técnica em que se observa a migração das células após a realização de uma fenda artificial, que pode ser denominada de arranhão. Estas células estão dispostas em uma monocamada, que tendem a se moverem na direção da fissura com o intuito de fechar o arranhão, promovendo a estabilidade do novo contato entre as células (LIANG; PARK; GUAN, 2007; GLAß, et al., 2012).

A realização do scratch consiste basicamente na criação da fenda (arranhão) na monocamada de células, seguida de registros fotográficos nos intervalos determinado para a avaliação da migração celular no sentido de fechar o arranhão e o comparativo das imagens para determinação do percentual de migração em comparação com os controles utilizados no ensaio (LIANG; PARK; GUAN, 2007; KRAMER et al., 2013).

Estudos evidenciam as vantagens apresentadas pelo ensaio do scratch, no qual de acordo com Goetsch e Niesler (2011) este é um método adequado para migração de células

aderentes, possibilita uma precisão na equação do percentual de reparo tecidual, possui um custo efetivo acessível para laboratórios de cultivo celular, viabiliza uma análise morfológica e a disposição proteica das células e permite uma avaliação preliminar para ensaios cicatrizantes em animais.

Para este ensaio biológico, são utilizadas as células que comumente estão envolvidas no processo cicatricial, estudos recentes evidenciam algumas dessas linhagens celulares como as epiteliais envolvidos em lesões da córnea (KUMARI et al., 2018), células do epitélio respiratório nasal e do epitélio brônquico foram avaliados no processo migratório e na regeneração da lesão tissular (SCHWARTZ et al., 2018), os queratinócitos (PLANZ; WANG; WINDBERGS, 2018) e os fibroblastos foram testados para cicatrização de feridas da pele (BAYRAMI et al., 2018), todas as pesquisas supracitadas foram realizadas pelo ensaio de scratch.

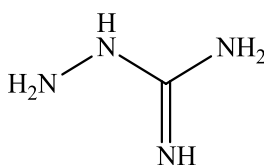
Os fibroblastos são utilizados em testes *in vitro* devido a sua função fisiológica para o equilíbrio após uma solução de continuidade na pele, estas células são responsáveis pela síntese, reposição e remodelamento da matriz extracelular, proliferação, migração, incitar o crescimento e a ativação de proteases (ROLIN et al., 2014; JIANG et al., 2018).

Além disto, os fibroblastos são responsáveis pela produção de colágeno em grandes quantidades, fornecendo sustentação e elevando a resistência para a nova matriz extracelular que surgiu para cicatrização da ferida (MARTIN; NUNAN, 2015; STUNOVA; VISTEJNOVA, 2018). Desta forma, todas essas funções exercidas pelos fibroblastos fornecem dados consistentes para a realização de ensaios *in vitro* como o scratch, utilizando estas linhagens celulares para avaliação de novas terapêuticas cicatrizantes.

2.1 Aminoguanidinas hidrazonas

As aminoguanidinas hidrazonas constituem uma classe de substâncias com interesse de pesquisas atualmente, tendo em vista suas propriedades biológicas e químicas. A aminoguanidinas nada mais é que a estrutura da guanidina ligada a um grupamento amino (Figura 5) (CLAYDEN et al., 2009; AQUINO, 2016).

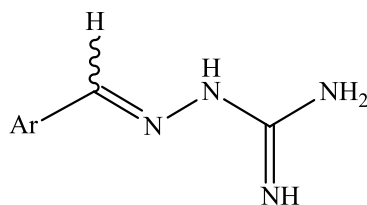
Figura 5 - Estrutura química da aminoguanidinas.



Fonte: Autor, 2019.

A aminoguanidinas hidrazonas é formada pela adição de um carbono imínico ao nitrogênio 3 (Figura 6). Os estudos avaliando as propriedades medicinais das aminoguanidinas hidrazonas são realizados há alguns anos, a atividade antitumoral frente a células do sarcoma foi testada por Agrawal et al. (1974) no qual avaliou cinco compostos, dentre eles, o 5-Hidroxi-2-formilpiridina guanil-hidrazona, contudo, este não apresentou resultado satisfatório quando comparado às demais substâncias como inibidores da síntese de DNA (AGRAWAL et al., 1974).

Figura 6 - Estrutura química da aminoguanidinas hidrazona.



Fonte: Autor, 2019.

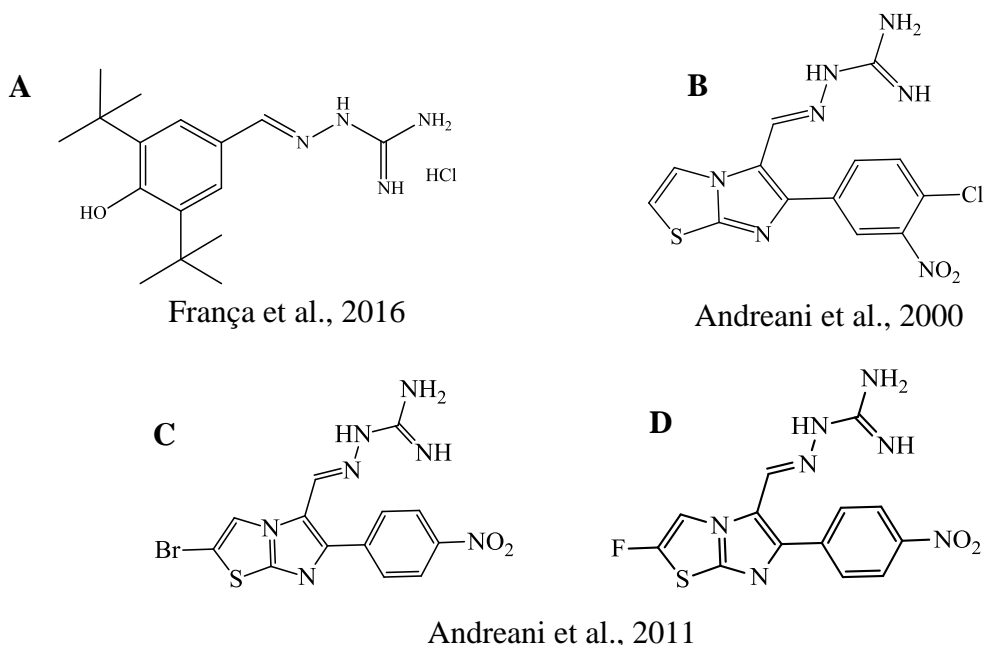
Em uma pesquisa recente foram avaliados vinte compostos aminoguanidinas hidrazonas frente a linhagens tumorais de carcinoma do cólon, melanoma e glioblastoma, em que uma substância apresentou maior seletividade para as células testadas com inibição de 97,2%, 92,6% e 97,8%, respectivamente, (Figura 7 A) sendo uma potente propriedade medicinal com perspectivas para terapêuticas antitumorais (FRANÇA et al., 2016).

Uma série de substâncias imidazo [2,1-b] tiazolguanilhidrazona foram testadas frente as sessenta tipos de linhagens de células cancerígenas, três compostos apresentaram-se mais ativos e destes um estava relacionado ao possível mecanismo de ação da inibição quinase dependente de ciclina 1 (CDK1) (Figura 7 B) (ANDREANI et al., 2000).

A partir da série de supracitada, o mesmo grupo de pesquisa sintetizou uma nova classe de compostos, e foi evidenciado que dois compostos apresentaram seletiva inibição da

quinase RSK2 e elevada atividade frente à linhagem de células tumorais de mama MCF-7 (Figura 7 C, D), com esse possível mecanismo estes compostos poderiam ser uma opção para terapêutica antitumoral que atuariam no ciclo celular (ANDREANI et al., 2011).

Figura 7 – Aminoguanidinas hidrazonas com propriedades antitumorais.



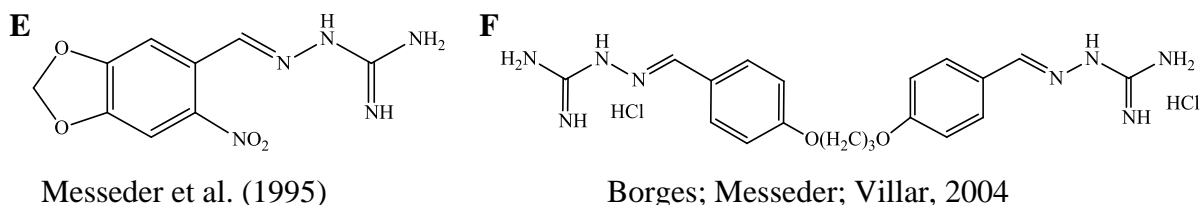
As aminoguanidinas hidrazonas (ou Guanilhidrazonas) também são alvos de pesquisas tripanossomicida, no qual Messeder et al. (1995) testaram mais de vinte compostos frente ao parasito *Trypanosoma cruzi*, e foi observado que o composto mais ativo (Figura 8 E) apresentou IC₅₀ de 17,1 µg/mL, o possível mecanismos de ação deste composto estaria relacionado com ausência de substituintes que formam as interações de hidrogênio. Outro mecanismo de ação das guanilhidrazonas dá-se por meio da interação com o DNA do *T. cruzi* o qual permite a atividade eficaz desta classe de compostos (SANTOS-FILHO; FIGUEROA-VILLAR; ARAÚJO, 1997).

Algumas bis guanilhidrazonas foram avaliadas frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o composto mais ativo foi o cloridrato de 1,3-bis (4-guanil-hidrazonofenoxi) –propano (Figura 8 F), a ação desta substância poderia está relacionada à atividade catiônica da membrana ou com o DNA do parasito, embora a substância apresenta uma boa atividade tripanossomicida, quando comparadas com as guanilhidrazonas simples foram consideradas menos ativas (BORGES; MESSEDER; FIGUEROA-VILLAR, 2004).

As guanilhidrazonas foram avaliadas após a interação com as micelas, no qual foi evidenciada atividade satisfatória em testes *in vitro* com o *T. cruzi* para a forma

tripomastigotas do parasito, podendo associar esta propriedade medicinal com a interação da membrana celular do microrganismo (BORGES; FIGUEROA-VILLAR, 2000).

Figura 8 - Guanilhidrazonas com atividade tripanossomicida.



Explorando as propriedades biológicas destes compostos, a atividade antimicrobiana foi avaliada por alguns autores, no qual, na pesquisa de Bairwa e colaboradores (2010) os compostos de ácidos cinâmicos e as guanilhidrazonas foram avaliados frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, apresentando uma concentração inibitória de 6,49 µg/mL, este foi o resultado do composto mais ativo da série estudada, sendo um alvo de interesse para pesquisas futuras contra a tuberculose e fornece dados para uma possível associação sinérgica com fármacos padrão nesta terapêutica.

Outras cepas bacterianas Gram positivas e negativas foram testadas com uma série de substâncias de aminoguanidinas hidrazonas, no qual foi evidenciada concentração inibitória de 1µg/mL frente à *Salmonella typhimurium*, sendo este eficaz de 1 a 2 vezes quando comparado ao controle padrão utilizado, foram avaliados ainda com cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina e quinolona, com resultados promissores quando comparado ao controle positivo (WEI et al., 2016).

Em uma pesquisa publicada recentemente, constatou-se que derivados desta classe de substâncias apresentaram efeitos de inibição de bombas de efluxo NorA em *Staphylococcus aureus* resistente, e quando associado ao antibiótico norfloxacina reduziu as concentrações inibitórias variando de 2 a 16 vezes a inibição, desta forma, esta foi a primeira publicação com as aminoguanidinas hidrazonas utilizadas nesta linha de pesquisa (DANTAS et al., 2018)

Outras propriedades medicinais foram testadas e publicadas com os derivados aminoguanidinas hidrazonas tais como, atividades anti-malária, anti-HIV (AHMED et al. 2012), testes antifúngicos e anti-inflamatórios *in vivo* (WEI et al., 2016), avaliação anti-hipertensiva (FOYE et al., 1990), Antidiabética (LARSEN et al., 2001). Diante do exposto, esta classe de substância mostra-se promissora para ampliar as atividades biológicas referidas acima.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os derivados aminoguanidinas hidrazonas com potencial atividade antimicrobiana e migração celular *in vitro*.

3.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima das aminoguanidinas hidrazonas;
- Avaliar a viabilidade celular por meio do teste colorimétrico do Metiltetrazolium das aminoguanidinas hidrazonas;
- Avaliar o potencial da migração celular *in vitro* (*Scratch Assay*) das aminoguanidinas hidrazonas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa do tipo experimental *in vitro* de abordagem quantitativa e qualitativa, na qual foram sintetizados derivados aminoguanidinas hidrazonas para a avaliação da atividade antimicrobiana com o método de Microdiluição em Caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e o teste migração celular *in vitro* utilizando *Scratch assay*.

4.1 Locais do estudo

A síntese dos derivados aminoguanidinas hidrazonas realizou-se no Laboratório de Química Medicinal (LQM), da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR); o ensaio da Microdiluição em Caldo ocorreu no Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) da EENFAR e o teste viabilidade celular e migração celular *in vitro* utilizando a técnica *Scratch assay* foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) todos na Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

4.2 Síntese dos derivados Aminoguanidinas hidrazonas.

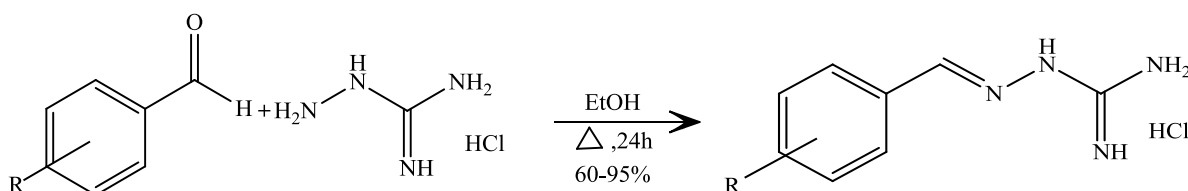
A síntese das substâncias deste estudo foi realizada com modificações estruturais com base na pesquisa realizada por Veríssimo e colaboradores (2017), no qual utilizou as substâncias denominadas LQM de 1 a 19, sendo avaliada a atividade cicatrizante de feridas infectadas. A partir destes resultados, novos derivados foram sintetizados e selecionados para este estudo, gerando também 18 substâncias, identificadas pela sigla LQM, cujo esquema reacional de obtenção está ilustrado abaixo.

As aminoguanidinas hidrazonas foram preparadas pela reação de um aldeído aromático com cloridrato de aminoguanidinas (1:1,25) (Figura 9). Os reagentes foram dissolvidos numa quantidade mínima de etanol, sendo aquecidos sob refluxo e agitados *overnight* (FRANÇA et al., 2016).

Após arrefecimento até à temperatura ambiente, os produtos precipitaram e foram recuperados, filtrando-se sob vácuo. Quando não precipitaram, o solvente foi evaporado a vácuo. Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e os produtos obtidos na forma de pó foram caracterizados por RMN de hidrogênio e carbono

treze, ponto de fusão, infravermelho; e a pureza verificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)(FRANÇA et al., 2016).

Figura 9 - Rota sintética das substâncias aminoguanidinas hidrazonas.



Fonte: Autor, 2019.

Para o cálculo do logaritmo do coeficiente de partição (Log P) das aminoguanidinas hidrazonas foi utilizado o software Marvin – ChemAxon. Foi realizado o cálculo das substâncias sem o cloridrato (HCl), pois o programa não reconhecia o HCl e a substância LQM como um composto único, mostrando o valor do Log P do HCl separado.

4.3 Ensaios biológicos *in vitro*

4.3.1 Microrganismos utilizados

Os microrganismos testados foram às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) e as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 14942), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). Optou-se neste estudo por esses microrganismos, pois as cinco primeiras são as mais frequentes em infecções de feridas e por agravarem o processo de cicatrização das lesões tissulares (MASSIE et al., 1992; ANGEL et al., 2011; SANTOS, et al. 2016), e mais raramente a *S. flexneri* (GREGORY; STARR; OMDAL, 1974).

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da Microdiluição em Caldo.

O teste de Microdiluição em Caldo avaliou a atividade antimicrobiana das aminoguanidinas hidrazonas. O protocolo seguido foi baseado no Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) na qual o Caldo Mueller-Hinton foi distribuído nas placas de

microdiluição de 96 poços, formada por 12 colunas (1 - 12) e 8 linhas (A - H), onde foram depositados 100 µL de meio por poço.

A concentração estoque da solução contendo as substâncias sintéticas foi de 400 µg/mL. Nas colunas de 1 a 9 da linha A foram adicionados 100µL de solução estoque e enquanto as colunas 10, 11 e 12 foram destinadas respectivamente, para o Controle Negativo (CN), com DMSO diluído em solução salina estéril, caldo Mueller-Hinton e o inóculo bacteriano; Controle de Crescimento (CC), em que foram utilizados Caldo Mueller Hinton e o inóculo microbiano; e Controle de Esterilidade da placa (CE), no qual foi utilizado apenas o Caldo Mueller-Hinton. Para o controle positivo foi usado o antibiótico Ciprofloxacina.

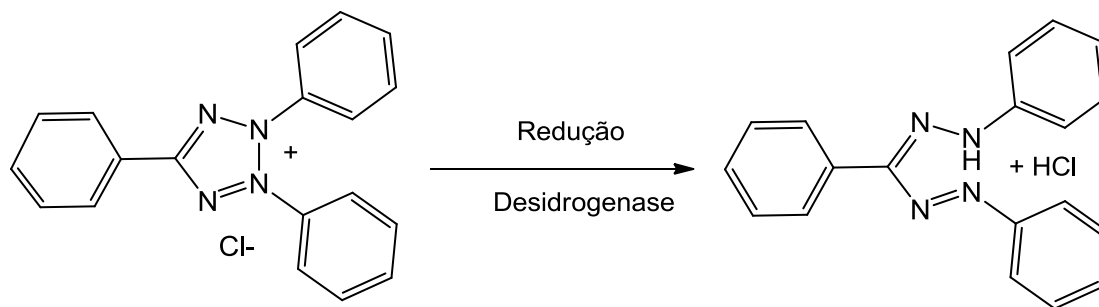
Após esse processo, 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A, foi transferido para a linha B e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo assim o processo até a linha H no qual foi desprezado o excesso, obtendo-se as seguintes concentrações 200 a 1,56 µg/mL. Em seguida as placas passaram por leitura da absorbância a 492 nm, em espectrofotômetro antes da inoculação bacteriana.

Os inóculos microbianos foram preparados baseado no protocolo proposto pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS) de 2003, utilizando a escala de 0,5 de McFarland (1×10^8 Unidade Formadora de Colônias/mL). As bactérias foram diluídas em 3 mL de solução salina estéril e 1 mL dessa solução foi rediluída na proporção de 1:10 de solução salina estéril para obter a concentração de 10^7 UFC/mL. Foram adicionados 5 µL do inóculo bacteriano no poço com meio de cultura, resultando na concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (ou 10^4 UFC/poço), sendo depositados nos poços das colunas de 1 a 11.

As microplacas foram embaladas em papel filme e incubadas em uma estufa bacteriológica a 35 °C de 16 a 20 horas, após esse período, foi realizada uma nova leitura no espectrofotômetro, e logo após foi acrescentado em cada orifício, 20 µL de uma solução aquosa de Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC) à 5% (v/v) sendo as placas reincubadas a 35 °C por mais 3 horas.

O Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium incolor, é reduzido a ao sal formazam (Figura 10) por ação das desidrogenases presentes nas mitocôndrias dos microrganismos, esta redução confere uma coloração vermelha nas bactérias que permaneceram vivas (OPWIUS et al., 2012).

Figura 10 - Reação de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium para formazam.



(Fonte: OPWIUS et al., 2012)

Após a última incubação, observou-se houve a presença de coloração avermelhada nos poços, indica que não teve inibição do crescimento microbiano, enquanto que a inexistência da coloração avermelhada indica que a substância possui uma ação inibitória frente ao microrganismo testado.

4.3.3.1 Cálculo da inibição microbiana

Com a leitura espectrofotométrica foi determinada a inibição microbiana para cada microrganismo, que foi calculada por meio da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas, para cada microrganismo de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = \left[1 - \left(\frac{Ac}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Onde:

A_c representa a média das absorvâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorvância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo;

A_0 a média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). Para determinação do percentual de inibição bacteriano, foi considerada toda substância que apresentou valor superior a 80% do crescimento microbiano quando comparado com o controle de crescimento (HOLETZ, et al. 2002).

4.3.4 Ensaio de viabilidade celular por meio do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

Todas as substâncias foram avaliadas no modelo de viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774, e foram consideradas não tóxicas aquelas que apresentaram viabilidade acima de 80% (dados não publicados). A partir desses resultados, foram selecionadas dez substâncias para prosseguir com os ensaios biológicos. Sendo as aminoguanidinas hidrazonas LQM 96, LQM 97, LQM 101, LQM 106, LQM 131, LQM 132, LQM 134, LQM 135, LQM 138 e LQM 195.

O teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT) foi realizado para identificar a atividade citotóxica das aminoguanidinas hidrazonas. Essa técnica é capaz de avaliar o estado metabólico da célula e a viabilidade celular a partir da redução do sal tetrazólio (coloração amarela) a formazan (coloração azul escuro), sendo utilizado para a avaliação da viabilidade celular *in vitro*.

O teste se baseia na atividade mitocondrial das células pela redução do sal MTT, essa redução acontece através da clivagem do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, em cristais de formazan que possuem uma coloração azul escuro, pela enzima succinato desidrogenase, que se encontra nas mitocôndrias ativas. A densidade óptica da reação resultante é determinada pelo espectrofotômetro. Quanto mais escura a coloração ao fim da reação, maior a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

As substâncias selecionadas foram avaliadas com células de fibroblastos 3T3, o qual foram cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (FBF), L-glutamina (2 mM) e gentamicina (40 µg/mL) em incubadora umidificada em atmosfera com 5 % de CO₂ a 37 °C.

Para início do teste, os Fibroblastos 3T3 foram adicionados em placas de 96 poços com a densidade de 7 x 10³ células / poço, e após 16 h de incubação (37 °C), as células aderentes foram tratadas com as substâncias LQMs nas concentrações de 10 e 100 µg/mL em meio de cultura DMEM suplementado com 5 % de soro fetal de bovino, L-glutamina e gentamicina foram posteriormente cultivados durante 24 horas (37 °C).

Em seguida, Após a incubação com o tratamento das substâncias, foram adicionados 22,5 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich - EUA) (5 mg/mL em PBS) a cada poço durante 4 horas de incubação a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e uma solução de DMSO (150 µl/poço) foi adicionada em cada placa de cultura para solubilizar os cristais de formazan formados. Como controle de morte celular foi

utilizado o Tween a 3 %. A absorbância de cada poço foi registrada utilizando um espectrofotômetro de microplacas e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm.

Foram utilizadas quatro cavidades individuais por tratamento com os compostos, e a atividade de redução de MTT foi determinada com a porcentagem de células em comparação com os grupos controle. Assim o percentual de viabilidade celular foi calculado por meio da fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{absorbância de células tratadas}}{\text{absorbância de células não tratadas}} \times 100$$

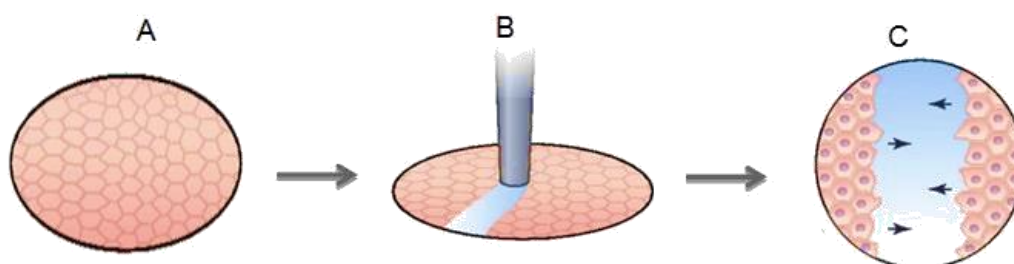
4.3.5 Ensaio da migração celular *in vitro* (*Scratch Assay*)

Os efeitos das substâncias LQM 96, LQM 97, LQM 101, LQM 106, LQM 131, LQM 132, LQM 134, LQM 135, LQM 138 e LQM 195 na migração de fibroblastos 3T3 foram avaliados por ensaio de cicatrização por arranhadura

No teste de migração celular os fibroblastos 3T3 foram cultivados em garrafas para cultura celular estéril (poliestireno), contendo meio de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e adicionados em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas, para alcançarem alta confluência. Após a constatação da confluência da monocamada, foram realizadas as subculturas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas.

Após esse processo, os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços (7 x 10⁴) e mantidos em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, até atingirem confluência máxima. Verificado a confluência, o sobrenadante do meio de cultura foi desprezado, e foi substituído por meio de cultura DMEM suplementado com SFB 2%, e em seguida foi realizado o ensaio de *Scratch*, ou seja, um risco em linha reta na região mediana da placa com a ponta da pipeta de 200µL (Figura 11). Este procedimento leva a uma solução de continuidade entre as células. A remoção das células que resultaram do arranhão, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Figura 11 - Técnica de arranhadura (Scratch assay) dos fibroblastos 3T3.



Nota: A – Aderência celular. B – Arranhadura na região mediana do poço. C – Migração celular.
Fonte: Adaptado de VEDULA et al., 2013.

Em seguida, as placas receberam as substâncias LQMs que foram utilizadas na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo que esta concentração foi definida de acordo com o teste de viabilidade celular MTT já realizado, e o controle foi determinado com o meio de cultura DMEM suplementado com SBF 2% (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

As imagens foram captadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase (Olympus IX70), utilizando *software* NIS Elements F3.2 e foram obtidas do mesmo campo de visão da ferida, criando pontos de referência na parte externa da placa e na platina do microscópio com marcadores de ponta fina. Desta forma, a avaliação da migração dos fibroblastos foi realizada por meio das fotografias nos tempo de 0, e 24 horas.

4.3.6 Análise estatística

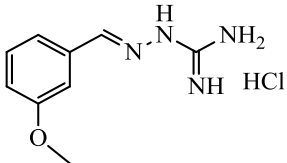
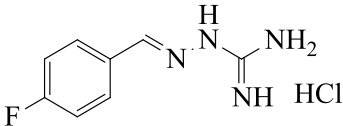
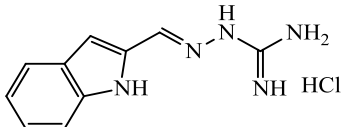
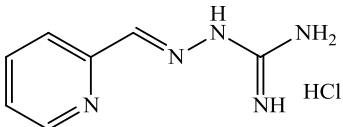
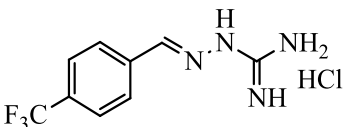
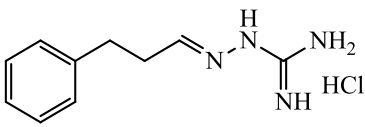
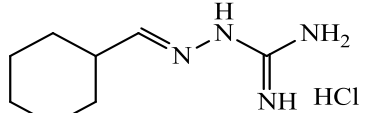
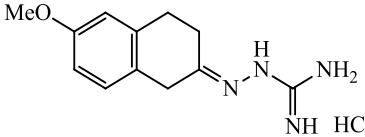
Os dados são expressos como média \pm SEM. A análise estatística foi determinada usando o teste t de Student. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Os gráficos foram gerados usando o *software* GraphPad Prism.

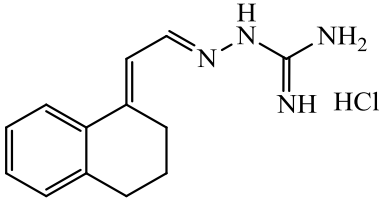
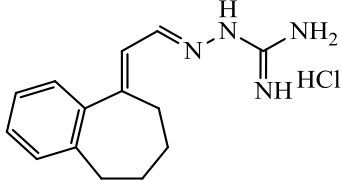
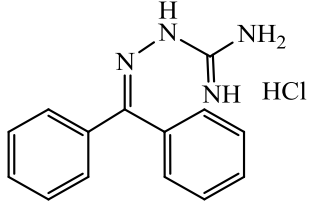
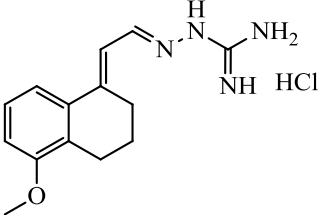
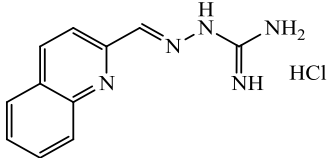
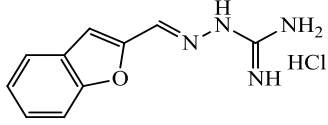
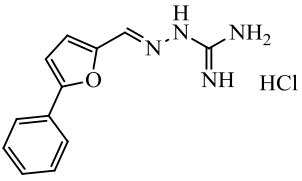
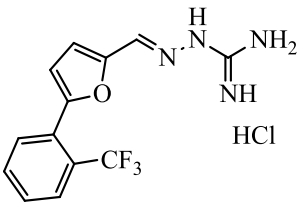
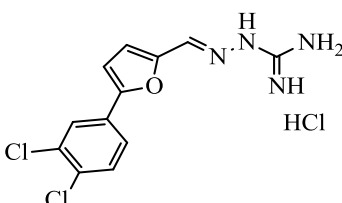
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

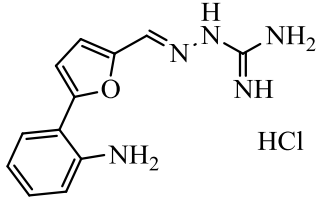
5.1 Síntese das substâncias aminoguanidinas hidrazonas

As dezoito aminoguanidinas hidrazonas foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Medicinal (LQM). Este trabalho foi responsável por avaliar as atividades antimicrobianas e migração celular *in vitro* dessas substâncias, que estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Estruturas químicas das aminoguanidinas hidrazonas.

Código	Fórmula molecular	Log P	Peso molecular	Estrutura química
LQM 96	C ₉ H ₁₃ ClN ₄ O	0,81	228,68	
LQM 97	C ₈ H ₁₀ ClFN ₄	1,11	216,64	
LQM 101	C ₁₀ H ₁₂ ClN ₅	0,99	237,69	
LQM 104	C ₇ H ₁₀ ClN ₅	0,42	199,64	
LQM 106	C ₉ H ₁₀ ClF ₃ N ₄	1,85	266,65	
LQM 131	C ₁₀ H ₁₅ ClN ₄	1,18	226,71	
LQM 132	C ₈ H ₁₇ ClN ₄	1,01	204,70	
LQM 133	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O	1,37	268,74	

LQM 134	$C_{13}H_{17}ClN_4$	2,05	264,75	
LQM 135	$C_{14}H_{19}ClN_4$	2,50	278,78	
LQM 136	$C_{14}H_{15}ClN_4$	2,71	274,75	
LQM 138	$C_{14}H_{19}ClN_4O$	1,89	294,78	
LQM 195	$C_{11}H_{12}ClN_5$	1,80	249,70	
LQM 196	$C_{10}H_{11}ClN_4O$	1,05	238,67	
LQM 197	$C_{12}H_{13}ClN_4O$	1,59	264,71	
LQM 198	$C_{12}H_{12}ClF_3N_4O$	2,47	332,71	
LQM 199	$C_{12}H_{11}Cl_3N_4O$	2,80	333,60	

LQM 200	$C_{12}H_{14}ClN_5O$	0,77	279,3	
----------------	----------------------	------	-------	---

As modificações estruturais das substâncias mostram-se com características distintas, tais como, grupos retiradores de elétrons, aumento da hidrofobicidade e prolongamento de cadeia lateral (espaçador).

Outro parâmetro avaliado foi o logaritmo do coeficiente de partição (Log P), que de acordo Lipinski e colaboradores (2001) e Duchowicz e colaboradores (2007), para que uma substância apresente solubilidade e permeabilidade é preciso algumas características que é mencionada na Regra de Lipinski, e dentre os itens desta regra é citado que o valor de Log P ideal deve ser abaixo de 5, desta forma, a substância poderia penetrar nas membranas e promover seu efeito farmacológico.

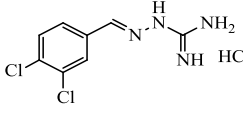
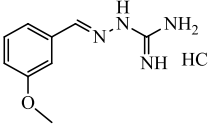
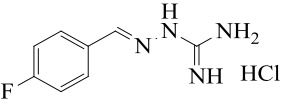
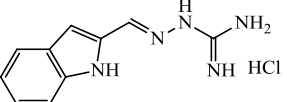
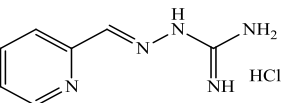
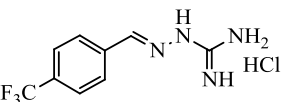
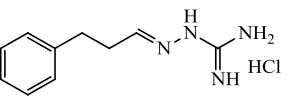
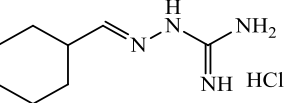
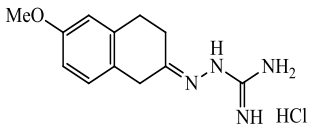
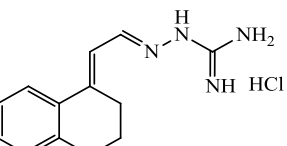
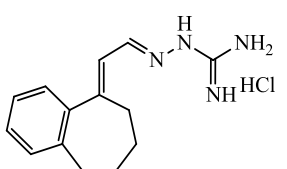
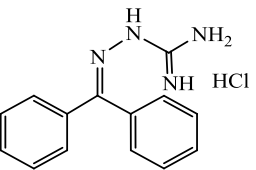
A partir das substâncias sintetizadas foram realizados testes biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana e migração celular *in vitro* das aminoguanidinas hidrazonas, e os resultados foram discutidos com base nas modificações estruturais apresentadas pelas substâncias.

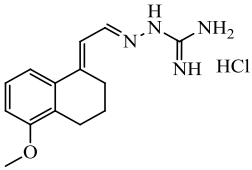
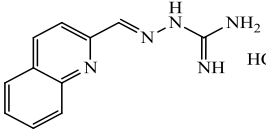
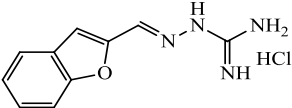
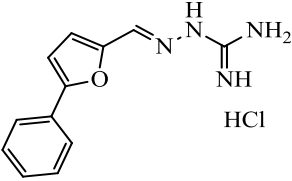
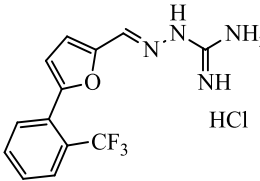
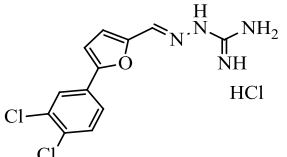
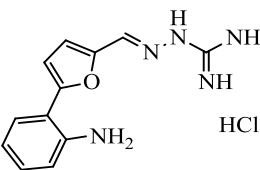
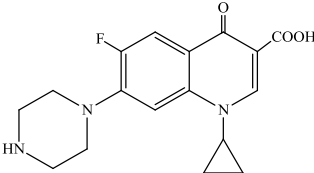
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da Microdiluição em Caldo.

O ensaio da CIM foi realizado com cepas bacterianas Gram positivas e negativas. Na tabela 2, se observa os valores das CIMs frente às cepas *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, bem como os respectivos valores percentuais de inibição.

De modo geral, os compostos testados apresentaram valores de CIM variando entre 5 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Em adição, no que se refere às cepas *S. aureus* e *S. epidermidis*, as substâncias LQM 106, 131, 198 e 199 demonstraram inibição nas concentrações de 25, 20, 20 e 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, todas com percentual de inibição bacteriano superior a 90%. Por fim, a melhor atividade bacteriana foi observada para o LQM 199, com a menor inibição na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ para as duas estirpes testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima das substâncias aminoguanidinas hidrazonas frente às cepas bacterianas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Código	Estrutura química	Concentração inibitória mínima			
		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
		[µg/mL]	%	[µg/mL]	%
LQM 17*		0,38	--	3,6	--
LQM 96		200	99,2	200	89,7
LQM 97		100	99,2	100	99,5
LQM 101		--	--	--	--
LQM 104		--	--	--	--
LQM 106		25	98,9	25	97,3
LQM 131		20	99,8	20	99,7
LQM 132		100	91,4	200	98,5
LQM 133		100	99,2	100	99,4
LQM 134		100	99	100	99,1
LQM 135		50	97,6	100	99,2
LQM 136		50	99,3	50	86,6

LQM 138		50	99,2	50	88,6
LQM 195		50	96,9	100	95,4
LQM 196		100	100	200	99,4
LQM 197		25	99,3	50	99,9
LQM 198		20	99,7	20	99,1
LQM 199		5	98,6	5	99
LQM 200		50	99	50	99,4
Ciprofloxa cina**		0,15	100	0,31	100

Nota: -- Nenhum percentual de inibição observado; [$\mu\text{g/mL}$] concentração em microgramas por mililitro; % percentual de inibição bacteriana; Ciprofloxacina utilizado como controle positivo.

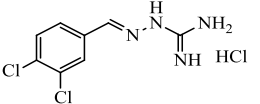
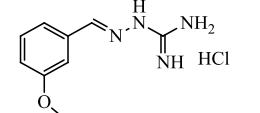
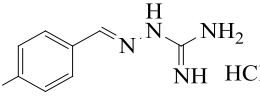
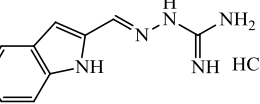
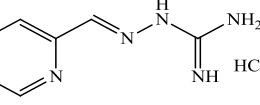
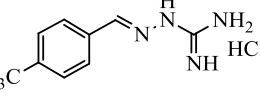
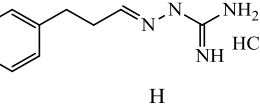
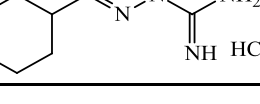
Fonte: * Os dados do LQM 17 foram apresentados por Veríssimo e colaboradores (2017). **Estrutura química da Ciprofloxacina, ZHANG et al., 2011.

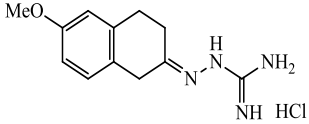
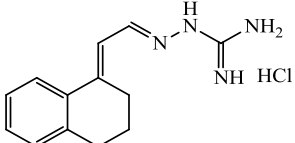
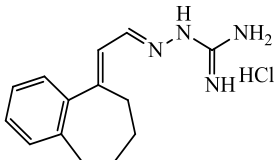
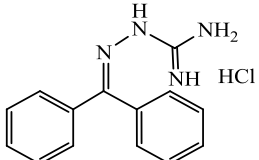
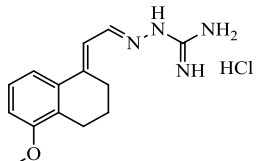
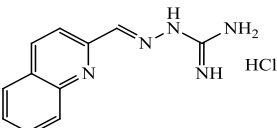
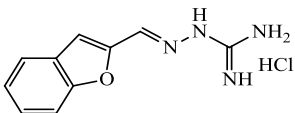
Com relação à avaliação das cepas Gram negativas, quatro bactérias foram utilizadas para determinar os valores da CIM, sendo elas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e a *Shigella flexneri*. Em seguida, todos os dados foram tratados e organizados na Tabela 3.

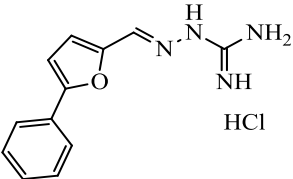
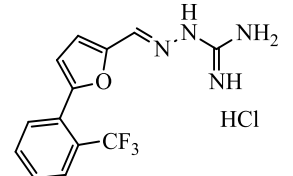
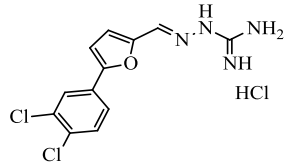
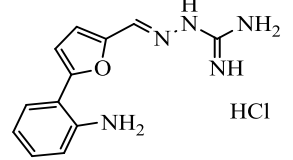
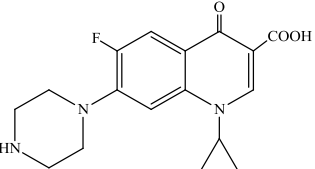
Foi observado que a maioria das aminoguanidinas hidrazonas testadas inibiu a bactéria *E. coli*, com exceção dos compostos LQM 96, 101 e 104 (os quais não demonstraram

inibição). Adicionalmente, os valores da CIM mais significativos variaram entre 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Para as cepas *P. aeruginosa* e *E. cloacae*, o LQM 199 mostrou valores de inibição de 10 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As substâncias LQM 131, 198 e 199 (CIM 12,5; 25 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) exibiram resultados promissores frente à cepa *S. flexneri*, quando comparado aos demais compostos.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima das substâncias aminoguanidinas hidrazonas frente às cepas bacterianas Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e a *Shigella flexneri*.

Código	Estrutura química	Concentração inibitória mínima							
		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. clocae</i>		<i>S. flexneri</i>	
		[μg/mL]	%	[μg/mL]	%	[μg/mL]	%	[μg/mL]	%
LQM 17*		15,5	--	29,3	--	--	--	--	--
LQM 96		--	--	200	93,2	200	90,9	--	--
LQM 97		20	99,8	100	97,3	--	--	--	--
LQM 101		--	--	--	--	--	--	--	--
LQM 104		--	--	--	--	--	--	--	--
LQM 106		20	99,9	50	99,8	100	99,8	50	99,9
LQM 131		25	95,6	50	97,5	50	99,4	12,5	99,6
LQM 132		20	98,5	200	96,0	--	--	--	--

LQM 133		200	99,8	--	--	200	93,8	100	99,3
LQM 134		20	99,4	200	99,7	--	--	200	99,3
LQM 135		20	99,5	200	99,4	200	99,8	100	99,4
LQM 136		20	99,6	--	--	200	99,7	100	99,8
LQM 138		20	99,9	--	--	200	99,7	100	100
LQM 195		20	97,6	100	98,9	--	--	200	93,6
LQM 196		20	99,3	200	99,7	--	--	200	97,9

LQM 197		20	99,8	200	99,9	200	99,8	100	99,8
LQM 198		20	98,6	50	99,9	50	99,5	25	99,9
LQM 199		5	99,9	10	99,9	12,5	99,6	6,25	99,8
LQM 200		20	99,1	100	98,7	--	--	100	99,9
Ciprofloxacina*		0,009	100	0,31	100	0,03	100	0,31	100

Nota: -- Nenhum percentual de inibição observado; [µg/mL] concentração em microgramas por mililitro; % percentual de inibição bacteriana; Ciprofloxacina utilizado como controle positivo.

Fonte: * Os dados do LQM 17 foram apresentados por Veríssimo e colaboradores (2017). **Estrutura química da Ciprofloxacina, ZHANG et al., 2011.

O controle positivo ciprofloxacina apresentou valores inferiores a concentração de 1 µg/mL na CIM, este antibiótico pertence a classe da fluorquinolona de terceira geração com ação na inibição da síntese de ácidos nucleicos (DNA girase) e apresenta amplo espectro bacteriano com efeito bactericida (HOPPER; WOLFSON; WOLFSON, 1991; VELEMA et al., 2015).

Os dados apresentados nas tabelas 2 e 3 sugerem que o LQM 199 com o substituinte 3,4-dicloro nas posições *meta* e *para* da fenila, apresentou os melhores resultados frente às bactérias Gram positivas e negativas. Em contraste, os derivados LQM 101 e 104 com substituintes 2-indol e 2-piridina foram completamente inativos frente às mesmas cepas.

Pesquisas realizadas com substâncias contendo grupamento aminoguanidinas, mostraram excelentes resultados frente às bactérias Gram positivas e negativas, onde um composto contendo átomos de cloro nas posições *orto* e *para* da fenila, apresentou atividade bacteriana variando entre 1 e 8 µg/mL, sobre as espécies *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa* (WEI et al., 2018).

No estudo de Dantas e colaboradores (2018) foi evidenciado que a aminoguanidinas hidrazonas contendo cloro nas posições *meta* e *para* da fenila exibiu um valor da CIM de 32 µg/mL frente à cepa de *S. aureus*, possuindo atividade superior ao controle positivo. Neste estudo, o LQM 199, mostrou-se mais ativo do que os demais compostos, com a CIM variando entre 5 e 12,5 µg/mL, esta substância também apresenta uma substituição 3,4-dicloro, o que corrobora com os estudos supracitados, o que pode sugerir que possivelmente a melhor atividade deste composto (LQM 199) estaria relacionando com a eletronegatividade apresentada pelo cloro.

A atividade bacteriana foi avaliada com uma série de *bis*-aminoguanidinas hidrazonas, onde todos os compostos se mostraram ativos no teste da CIM, dentre as cepas a *Enterobacter cloacae* apresentou inibição na concentração em 52,9 µg/mL (SHRESTHA et al. 2017), este dado assemelha-se às substâncias LQM 131 e 198 deste estudo, que para esta bactéria teve uma CIM de 50 µg/mL, respectivamente.

Diante dos resultados antimicrobianos apresentados, foi possível fazer uma relação estrutura-atividade para os compostos, desta forma, as moléculas serão agrupadas de acordo com as respectivas semelhanças químicas, bem como suas atividades.

Pode-se verificar na atividade antimicrobiana de bactérias Gram positivas para as substâncias que apresentavam em sua estrutura grupamentos retiradores ou doadores de elétrons se comportam de maneira diferente, por exemplo, a substância LQM 96 (CIM de 200 µg/mL) que apresentava uma metoxila (doador de elétron) e o LQM 133 (CIM de 100 µg/mL)

não apresentou atividade significativa, da mesma forma que grupos retiradores, como o LQM 97 (CIM de 100 µg/mL).

Adicionalmente, o LQM 97 para a cepa Gram negativa *E. coli* apresentou CIM de 92,3 µg/mL. Para tanto, a presença do CF₃ na posição *para* no composto LQM 106 reduziu significativamente (aproximadamente 8 vezes) a CIM quando comparado com o composto LQM 97. Além disso, houve inibição para as seis estirpes bacterianas Gram positivas e negativas. Considerando a ordem de eletronegatividade, a substância LQM 106 possui o substituinte mais eletronegativo que os demais e que sua atividade poderia estar relacionada a esta característica. Além disso, o LQM 106 apresentou o Log P de 1,85 sendo maior que seu análogo LQM 97 (Log P de 1,11), possivelmente a melhor atividade também estaria relacionado à lipofilicidade da substância.

Pesquisas mostram que o flúor faz ligações com enzimas e proteínas que são importantes para a fisiologia bacteriana, este faz ligação nos sítios que hidroxilas (OH) geralmente se ligam, podendo, por exemplo, inibir o papel da enolase durante a glicólise, primeira fase da respiração celular, a acidificação do meio também contribui para aumentar a ligação do flúor as enzimas (MARQUIS; CLOCK; MOTA-MEIRA, 2003). Desta forma, pode-se sugerir que possivelmente a inibição enzimática poderia estar relacionada à atividade do composto LQM 106.

Comparando as aminoguanidinas hidrazonas LQM 133, 134, 135, 136 e 138 foram observados que a atividade antimicrobiana mantiveram uma CIM com valores de inibição similares umas das outras. O LQM 134 apresenta um anel ciclohexano fundido à fenila e o composto LQM 135 apresenta um anel cicloheptano também fundido à fenila. Quando comparados os dois compostos, foi observado que o LQM 135 teve uma leve redução da atividade biológica para a cepa *S. aureus* com uma CIM de 50 µg/mL.

Comparando-se as substâncias LQM 132, 133, 134 e 138, o perfil é diferente para cada microrganismo, o composto LQM 132 (com anel ciclohexano), mostrou uma CIM com valores entre 100 e 200 µg/mL para as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* e foi inativa para a *E. cloacae* e *S. flexneri*. O composto LQM 132 passou por uma rigidificação do anel ciclohexano condensado a uma fenila, originando os LQM 133, 134 e 130, observou-se que o LQM 134 que não possui substituinte foi mais ativo apenas para a cepa *E. coli* (20 µg/mL). Ao se adicionar um grupamento doador de elétron (metoxila) na posição *para* (LQM 133), a atividade em todos os microrganismos é em concentrações altas ou ausência de atividade. Entretanto, quando a metoxila é adicionada na posição *meta* (LQM 138) e aumenta os carbonos ligados no anel fenil, a atividade é recuperada, porém, apenas para três

microrganismos sendo eles: *S. aureus* (50 µg/mL), *S. epidermidis* (50 µg/mL) e *E. coli* (20 µg/mL).

Ressalta-se que a bactéria *E. coli* foi sensível a quatro substâncias deste grupo, a exceção foi para o LQM 133 que apresentou uma CIM dez vezes maior que os demais compostos, foi observado que deste grupo de substância o LQM 133 apresentou o menor Log P 1,37 quando comparado aos demais LQM, o que pode esta relacionada a maior CIM para a cepa *E. coli*. A característica comum neste grupo de substâncias é o aumento da hidrofobicidade, com isto, sugere-se que possivelmente esta característica esteja relacionada às atividades antimicrobianas.

Substâncias com características hidrofóbicas atuam interagindo com a membrana celular dos microrganismos, nas bactérias o rompimento da permeabilidade da membrana causada por um composto leva ao efeito antimicrobiano (KIM; FARRAH; BANEY, 2007).

Na pesquisa realizada por Oliveira e colaboradores (2012) foi evidenciado que às substâncias testadas apresentaram uma relação com a lipofilicidade das moléculas, a atividade antimicrobiana foi menor com os compostos menos lipofílicos, ou seja, quanto mais hidrofóbica a substância melhor foi a sua atividade antimicrobiana.

Com relação ao composto LQM 131 foi realizado a adição de carbonos para aumentar a cadeia lateral da substância, esta modificação proporcionou resultados promissores na atividade antimicrobiana, causando a inibição nas seis estirpes testadas, sendo a melhor CIM para a cepa *S. flexneri* com inibição na concentração de 12,5 µg/mL. Adicionalmente, o LQM 131 passou por uma substituição do *anel* fenil sendo adicionado uma 2-quinolina (LQM 195), porém a atividade manteve-se alta, quando comprado ao seu precursor. As três substâncias (LQM 131 e 195) apresentaram inibição para a cepa *E. coli* com CIM de 25 e 20 µg/mL, respectivamente. Desta forma, foi evidenciado que o LQM 131 foi o mais promissor deste grupo de substância podendo associar a atividade biológica ao aumento da cadeia lateral do composto.

Com relação às substâncias que apresentavam o *anel* furano na estrutura, i.e., LQM 196, 197, 198, 199 e 200, o comportamento frente aos microrganismos Gram positivos é bem homogêneo, ou seja, LQM 196, que apresentava o *anel* furano fundido a fenila não apresentou atividade satisfatória para a *S. aureus* (100 µg/mL) e *S. epidermidis* (200 µg/mL). No momento em que os anéis não são mais fundidos (LQM 197 à LQM 200), a atividade aumenta significativamente, como pode ser verificado na tabela 2.

O LQM 197, que não apresentava substituinte, bem como o LQM 198 (grupamento CF₃ em *orto*), apresentou atividade moderada (20 a 50 µg/mL), a depender se *S. aureus* ou *S.*

epidermidis, observou-se uma potencialização para o LQM 199 (5 µg/mL, para *S. aureus* e *S. epidermidis*) uma vez que este foi o mais ativo de toda a série, o único que apresenta substituinte 3,4-dicloro na fenila ligado ao furano, sendo este composto considerado como o *hit* desta série.

Em relação aos microrganismos Gram negativos, o perfil de atividade para os derivados furânicos (LQM 196 a 200) é mais heterogêneo, no qual se observa que o furano condensado a fenila (LQM 196) não apresentou atividade significativa para nenhum dos microrganismos, a exceção para a cepa bacteriana *E. coli* (20 µg/mL). Para as substâncias com furanos não condensados a fenila (LQM 197 a 200), há uma variação de atividade moderada (20 a 50 µg/mL) à perda da atividade.

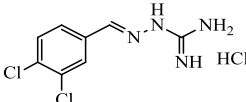
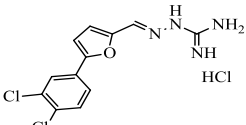
Comparando-se os LQM 197, 198 e 200, foi observado que o LQM 197 apresentou CIM em altas concentrações para as cepas Gram negativas, ao adicionar o CF₃ em *orto* na fenila (LQM 198) melhorou a atividade frente às cepas de *P. aeruginosa*, *E. clocae* e *S. flexneri* com CIM de 50, 50 e 25 µg/mL, respectivamente. Quando o CF₃ foi substituído por um NH₂ em *orto* na fenila originando o LQM 200, a inibição foi na concentração de 100 µg/mL para as bactérias *P. aeruginosa* e *S. flexneri*, e inativo para a cepa *E. clocae*. Nesse grupo de substâncias o LQM 198 é o que apresenta a maior eletronegatividade devido o substituinte CF₃ e também obteve o maior Log P 2,47, quando comparados aos LQM 197 e 200, possivelmente a atividade bacteriana estaria relacionada a essas características da molécula.

De maneira análoga as bactérias Gram positivas, o LQM 199 mostrou atividade significativa para todos os microrganismos (*E. coli* = 5 µg/mL; *P. aeruginosa* = 10 µg/mL; *E. clocae* = 12,5 µg/mL, *S. flexneri* = 6,25 µg/mL). Comparando o Log P do grupo de substância que apresentam o anel furano, observou-se que o LQM 199 foi o que apresentou maior Log P 2,80 e mostrou-se com menor CIM frente a todas as cepas testadas, desta forma, sugere-se que esta melhor atividade esteja relacionada à presença do 3,4 dicloro-fenila e a característica de lipofilicidade apresentada pelo log P. Observou-se que todos os LQM apresentaram atividade antimicrobiana moderada para *E. coli*, a exceção dos LQM 96, 101, 104 (que foram inativos) e 133 (CIM de 200 µg/mL).

Comparando-se os resultados de Veríssimo e colaboradores (2017) para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* com os dados desta pesquisa, o LQM 17 que apresentava uma dissubstituição do cloro no anel fenil (posições *meta* e *para*) e o LQM 199 apresentava também o átomo de cloro nas posições *meta* e *para* da fenila ligado a um anel furano mostraram atividades antimicrobianas heterogêneas para cepas Gram positivas e negativas,

quando comparado os resultados de ambos os compostos, ressaltamos a importância do grupamento 3,4 dicloro-fenila na atividade antimicrobiana desta classe de compostos, como pode ser verificado na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Comparação dos dados das substâncias LQM 17 com o LQM 199 para as frente às cepas bacterianas Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e a *Escherichia coli*.

Código LQM	Estrutura química	Concentração Inibitória mínima			
		<i>S. aureus</i> [µg/mL]	<i>S. epidermidis</i> [µg/mL]	<i>E. coli</i> [µg/mL]	<i>P. aeruginosa</i> [µg/mL]
17		0,38	3,66	15,5	29,3
199		5,0	5,0	5,0	10,0

Nota: [µg/mL] concentração em microgramas por mililitro. Fonte: os dados do LQM 17 foram apresentados por Veríssimo e colaboradores (2017).

Observou-se na comparação das Substâncias LQM 17 e 199, que para a estirpe bacteriana *S. aureus* os resultados foram distintos, e o LQM 17 apresentou a CIM dez vezes menor quando comparado com o LQM 199. Para a bactéria *S. epidermidis* os valores de ambas as substâncias foram similares. No entanto, para as bactérias Gram negativas o LQM 199 apresentou CIM inferior ao seu análogo, apresentando CIM três vezes menor que o LQM 17 para as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Desta forma, o LQM 199 quando comparado ao LQM 17 mostrou-se mais efetivo para as cepas Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* com CIM de 5 e 10 µg/mL, respectivamente, estas bactérias possuem importância clínica pelas infecções que podem causar, tais como, infecções urinárias, pulmonares, gastrointestinais, infecção da corrente sanguínea e cutâneas (SANTOS et al., 2016). Além disso, elas apresentam fatores de virulência (exemplo, adesinas, toxinas, biofilmes) eficientes principalmente no ambiente hospitalar, limitando as opções terapêuticas disponíveis (ROBINS-BROWNE, et al., 2016; AZAM; KHAN, 2019).

Observou-se que o LQM 199 apresentou atividade antimicrobiana frente às seis bactérias testadas, demonstrando ter um amplo espectro na ação antimicrobiana. Embora o controle positivo ciprofloxacina tenha apresentado inibição inferior a 1 µg/mL, a substância LQM 199 teve CIM variando de 5 a 12,5 µg/mL, observou-se que a potência de inibição foi

similar a ciprofloxacina, com percentual de inibição superior a 98%. Desta forma, pode-se sugerir que outras pesquisas mais específicas para compreender qual o possível mecanismo de ação antibacteriano sejam realizadas, assim como, a realização de novos ensaios antimicrobianos com outras espécies bacterianas pertencentes aos cinco gêneros testados neste estudo e também de cepas resistentes.

Ressalta-se que para a eficácia de uma substância os ensaios *in vivo* fazem parte da rotina na busca de possíveis fármacos, assim sendo, com a atividade antimicrobiana apresentada pelo LQM 199, estudos desta avaliação *in vivo* em animais de pequeno porte são necessários para a verificação da toxicidade em órgãos metabólicos e excretórios (Fígado e rins).

Nesta pesquisa foi possível evidenciar que as aminoguanidinas hidrazonas apresentaram promissoras atividades antimicrobianas frente às cepas Gram positivas e negativas. Para o prosseguimento na pesquisa, as dezoito substâncias foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo método MTT com macrófagos J774 em outra pesquisa (dados não publicados), as substâncias com viabilidade superior a 80%, seguiram para o teste de MTT com fibroblastos 3T3.

5.3 Ensaio de viabilidade celular por meio do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

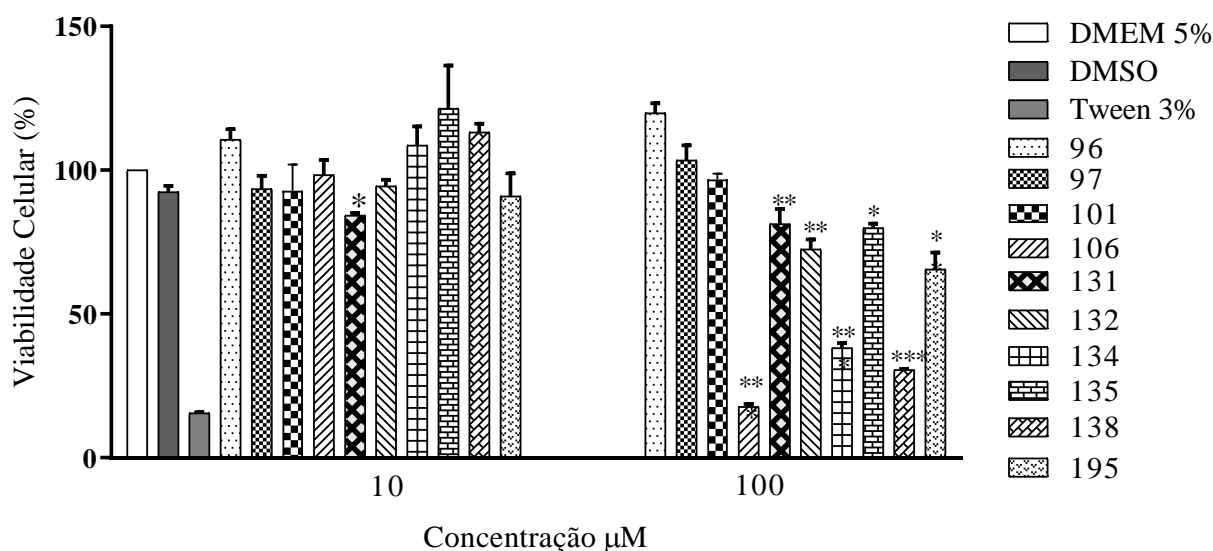
Na avaliação da citotoxicidade das amostras, observou-se que na concentração de 10 µg/mL as aminoguanidinas hidrazonas testadas apresentaram percentual de viabilidade superior a 80%, as substâncias LQMs 96, 134, 135 e 138 mostraram viabilidade de 110%, 108%, 121% e 113%, respectivamente, sendo esses valores superiores ao controle positivo utilizado no teste.

As substâncias LQM 97, 101, 106, 132 e 195 mantiveram o percentual acima de 90%, e a substância LQM 131 apresentou viabilidade celular de 84%, respectivamente, o que se pode evidenciar que na concentração de 10 µM todas as substâncias foram favoráveis para as células utilizadas no teste, e existe uma segurança para a realização dos testes no que concerne à toxicidade (Gráfico 1).

O DMSO apresentou viabilidade de 92,4%, e o Tween com 15,5%, em relação ao controle ciprofloxacina estudos mostram que na concentração e de 5 µg/mL não foi observado

citotoxicidade em linhagens células de fibroblastos e astrócitos no período de 24 horas (HINCAL; GÜRBAY; FAVIER, 2003; GÜRBAY et al., 2007).

Gráfico 1 - Viabilidade celular das substâncias aminoguanidinas hidrazonas na concentração de 10 μ M e 100 μ M.



Nota: As barras representam a média \pm SEM. A linha tracejada representa o grupo de controle (tratado com DMEM). Os dados foram expressos como % de células viáveis em comparação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ (Controle vs. tratamento).

Na concentração de 100 μ M a viabilidade celular foi mantida superior a 80% para as substâncias LQM 96 (119%), 97 (103%), 101 (96%) e 131 (81%), foi evidenciado que para as três primeiras aminoguanidinas hidrazonas houve um aumento do percentual de viabilidade, quando comparado com a concentração de 10 μ M.

As amostras LQM 106 e 138 apresentaram os menores valores de viabilidade celular, com percentuais de 17% e 30%, respectivamente. Evidenciou-se que nas demais aminoguanidinas hidrazonas testadas não foram favoráveis, pois apresentaram relevante toxicidade diante das células testadas.

Em uma pesquisa recente, a viabilidade celular das aminoguanidinas hidrazonas foram avaliadas em diferentes concentrações com a linhagem de macrófagos J774, observou-se que na menor concentração a maioria das substâncias apresentou viabilidade de 90%, e que iria diminuindo o percentual celular à medida que a concentração aumentava (DANTAS et al., 2018).

Os dados supracitados assemelham-se com o da pesquisa em questão, no qual na concentração de 10 μ M todas as substâncias foram viáveis, contudo, quando as células foram

testadas em 100 μM apenas quatro (LQM 96, 97, 101 e 131) mantiveram a viabilidade celular superior a 80%, as demais foram consideradas citotóxicas.

Desta forma, sugere-se que algumas das aminoguanidinas hidrazonas são dose dependentes, pois se observou que quanto maior a concentração testada, maior é a toxicidade e menor a viabilidade celular.

Duas aminoguanidinas hidrazonas com grupamento metoxi (CH_3O) em diferentes regiões do anel fenil, foram testada para a viabilidade celular utilizando fibroblastos de pulmão de hamster, foi evidenciado que nas concentrações de 1, 10 e 100 μM as substâncias não foram tóxicas para as células (PINHATTI et al., 2016). Messeder e colaboradores (1995) relataram em sua pesquisa que a série de substâncias de guanilhidrazonas não apresentou toxicidade das amostras testadas em linhagens celulares de eritrócitos.

Por meio do teste de viabilidade celular é possível determinar o seguimento da pesquisa de forma segura em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, tendo um equilíbrio entre o efeito tóxico e farmacológico. Contudo, uma substância que apresenta efeito citotóxico em células isoladas *in vitro* pode reagir de forma diferente quando testada *in vivo*, tendo em vista todas as células e mecanismos enzimáticos do corpo, porém, quando uma substância apresenta viabilidade celular é uma garantia de uma possível resposta clínica promissora (SENE et al., 2009).

A partir dos resultados do MTT com os fibroblastos 3T3 as substâncias com viabilidade superior a 80% foram selecionadas para a realização do ensaio de migração celular por meio do teste *scratch assay*.

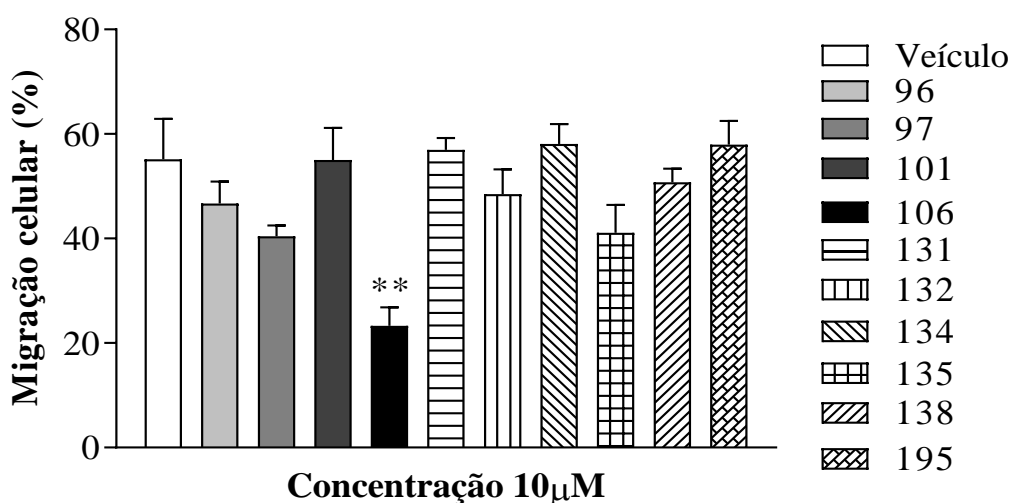
5.4 Ensaio da migração celular *in vitro* (Scratch Assay)

O teste de migração celular *in vitro* utilizou fibroblastos 3T3 para verificação da migração destas células, em feridas cutâneas esta célula desempenha uma função crucial no processo de fechamento das lesões, pois sintetizam e depositam componentes essenciais para a matriz extracelular, a citar o colágeno (CHEN et al., 2014).

Nesta pesquisa, para a avaliação da migração celular foram utilizadas as substâncias LQM 96, 97, 101, 106, 131, 132, 134, 135, 138 e 195 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a determinação desta concentração foi com base nos resultados do teste de viabilidade celular MTT realizado com a mesma linhagem celular (Fibroblastos 3T3), no qual se apresentaram com viabilidade superior a 80%.

Os resultados demonstraram que as substâncias LQM 101, 131, 134 e 195 se apresentaram de forma semelhante quando comparado ao controle positivo (55,17%), com percentuais de migração de 55,01%, 56,98%, 58,13% e 57,95%, respectivamente, ressalta-se que as três últimas substâncias apresentaram percentual levemente superior ao controle positivo, porém não foi considerado estatisticamente significativo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Migração celular das substâncias aminoguanidinas hidrazonas na concentração de 10 μ g/mL.



Nota: As barras representam a média \pm SEM. A linha tracejada representa o grupo de controle (tratado com DMEM). Os dados foram expressos como % de células viáveis em comparação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ (Controle vs. tratamento)

As demais substâncias LQM 96, 97, 132, 135 e 138 apresentaram percentual de migração entre 40 e 50%, sendo estes próximos ao controle positivo. Contudo, a substância LQM 106 causou a diminuição da migração dos fibroblastos para 23,31%, sendo esta com menor valor significativo comparado com as outras substâncias.

Com os resultados foram observados que as substâncias não apresentaram migração celular significativa, pois mantiveram os percentuais semelhantes ao grupo controle do teste, no qual as células foram tratadas com meio de cultura DMEM.

Na literatura não foram encontradas publicações com a migração celular *in vitro* testada com aminoguanidinas hidrazonas, para fins de comparação com os dados deste estudo, contudo, testes *in vivo* são mencionados em muitas pesquisas.

Foi verificado que um grupo de substâncias aminoguanidinas hidrazonas foram avaliadas para cicatrização de feridas infectadas e observou-se resultados promissores, com

diminuição do tempo de cicatrização e inibição bacteriana da estirpe *S. aureus* inoculada nas feridas (VERÍSSIMO, et al., 2017).

A aminoguanidina foi utilizada como profilático na avaliação da migração de neutrófilos em ensaios *in vivo* com ratos diabéticos, concluindo que o produto contendo a aminoguanidina inibiu os produtos finais de glicação avançada e proporcionou aos neutrófilos desempenhar a remoção do tecido necrótico e no aumento da resistência à oxidação, além de diminuir a apoptose celular, promovendo a cicatrização das feridas (TIAN et al., 2013).

Outro estudo *in vivo* com ratos diabéticos utilizou um creme contendo aminoguanidina em sua composição para avaliar a cicatrização de feridas, e foi atribuído aos resultados apresentados no estudo à capacidade da substância de regular a atividade antioxidante da glutaciona peroxidase e a geração de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-8, ICAM e IL-1 α , que foi reduzida significativamente no grupo dos animais tratados com a aminoguanidina (TIAN et al., 2016).

Desta forma, na pesquisa em questão evidenciou-se que as aminoguanidinas hidrazonas apresentaram atividade antimicrobiana, viabilidade celular dose dependente (em maiores concentrações não foram viáveis) e a migração celular *in vitro* apresentou parâmetros semelhante ao grupo controle.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, nesta pesquisa foi explorado por meio de testes realizados *in vitro* o potencial biológico de dezoito aminoguanidinas hidrazonas, com isto, conclui-se que:

- As aminoguanidinas hidrazonas apresentaram atividade antimicrobiana, as moléculas LQM 106, 131, 198 e 199 foram as mais promissoras frente às seis cepas testadas. As aminoguanidinas hidrazonas apresentavam os substituintes CF₃ na posição *para* (LQM 106), aumento da cadeia lateral (LQM 131), CF₃ na posição *orto* da fenila (LQM 198) e o cloro nas posições *para* e *meta* do anel fenila (LQM 199), o que possivelmente conferiu a referida atividade. A substância aminoguanidina hidrazona LQM 131 apresentou inibição bacteriana frente a cepa *S. flexneri* com a concentração inibitória mínima de 12,5 µg/mL. O LQM 199 manteve a menor concentração de todas as substâncias frente a todas as cepas (Gram positivas e negativas) com a CIM variando de 5 a 12,5 µg/mL. Duas substâncias foram inativas para a atividade antimicrobiana de todas as cepas utilizadas, sendo eles LQM 101 que apresentava 2-indol e o LQM 104 com substituinte 2-piridina.
- Observou-se que em relação à viabilidade celular com fibroblastos 3T3 todos os compostos foram mantiveram viabilidade superior a 80% na concentração de 10 µM. Contudo, quando aumentada concentração das aminoguanidinas hidrazonas para 100 µM apenas quatro substâncias (LQM 96, 97, 101 e 131) permitiu a viabilidade celular superior a 80%.
- Na avaliação da migração celular *in vitro* (*Scratch assay*) as aminoguanidinas hidrazonas foram testadas na concentração de 10 µM, porém, nenhuma das substâncias favoreceu a migração de fibroblastos quando comparado ao controle de teste.
- Evidenciou-se que a substância LQM 106 ocasionou a diminuição da migração dos fibroblastos para 23,31%, sendo o menor percentual de todas as moléculas, e possivelmente sugere-se que ocorreu por toxicidade celular.

7 PERSPECTIVAS

- Ressalta-se a necessidade em avançar com estudos para verificar os mecanismos de ação da substância LQM 199, pois apresentou atividade antimicrobiana para bactérias Gram positivas e negativas.
- Sugere-se a realização da avaliação antimicrobiana com outras espécies bacterianas dos referidos gêneros utilizados neste estudo com o LQM 199, e testes com bactérias que apresentam resistência bacteriana.
- Sugere-se estudos para o desenvolvimento de um produto para superfícies inanimadas com atividade antimicrobiana com a substância LQM 199, tendo em vista o potencial para varias cepas bacteriano.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, K. C. et al. Comparative studies of the antineoplastic activity of 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone and its seleno-semicarbazone, guanylhydrazone and semicarbazone analogs. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, n. 17, p. 2421-2429, 1974.

AHMED, N. et al. Synthesis and biological evaluation of tricyclic guanidine analogues of batzelladine K for antimalarial, antileishmanial, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 4, p. 491-8, 2012.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v.1, p. 134–45, 2010.

ANDREANI, A. et al. Imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones as RSK2 inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4311–4323, 2011.

ANDREANI, A. et al. Potential antitumor agents. part 291: synthesis and potential coanthracyclinic activity of Imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 2359–2366, 2000.

ANGEL, E. D et al. The clinical efficacy of two semi-quantitative wound-swabbing techniques in identifying the causative organism(s) in infected cutaneous wounds. **International Wound Journal**. v. 8, n. 2, p. 176-185, 2011.

AQUINO, P. G. V. **Síntese de análogos estruturais de aminoguanidinoídrazonas planejados como protótipos de fármacos anti-hipertensivos e protetores contra infarto do miocárdio e nova metodologia para formação de ligação c-n em meio aquoso**. 2016. 206 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

ARAÚJO, M.A et al. Uso de plantas medicinais para o tratamento de feridas. **Revista Interdisciplinar**, v. 8, n. 2, p. 60-67, 2015.

AZAM, M.W.; KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**. v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019.

BAIRWA, R. et al. Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 5, p. 1623-1625, 2010.

BAYRAMI, Z. et al. Bio-guided fractionation and isolation of active component from *Tragopogon graminifolius* based on its wound healing property. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, p. 48-55, 2018.

BELDON, P. Basic science of wound healing. **Surgery**, v.28, n. 9, p. 409-412, set, 2010.

BERGER, M. et al. Hemostasia: uma breve revisão. **Caderno pedagógico**, v. 11, n. 1, p.140-148, 2014.

BERNADO, T.H.L, et al. **Composição farmacêutica contendo derivados de Aminoguanidina com atividade antisséptica**. BR n. PI 102015003322-2 A2, 11 nov 2017.

BLAIR, J. M. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BORGES, M. N; FIGUEROA-VILLAR, J. D. NMR interaction studies of aromatic guanyl hydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2000.

BORGES, M. N; MESSEDER, J. C; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* activity and micelle interaction studies of bisguanylhydrazones analogous to pentamidine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 925–929, 2004.

BRASIL, ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: **Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015**. Dezembro, 2016.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Sítio cirúrgico: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde**. Brasília: ANVISA; 2009.

CALIXTO, C. M. F; CAVALHEIRO, É. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no desenvolvimento científico. **Química e Sociedade**, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.

CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 6, p. 183-190, 2010.

CAVALCANTE, A. S; ANJOS, P. P; VANDESMET, L. C. S. A descoberta da penicilina e a resistência de microrganismos aos antimicrobianos. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 01, p. 1-7, 2016.

Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). **Ameaças à resistência aos antibióticos nos Estados Unidos**, 2013.

CHEN, J. C. et al. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

CHOPRA, I; HESSE, L; O'NEILL, A. Discovery and development of new anti-bacterial drugs. **Pharmacochemistry Library**, v. 32, p. 213–225, 2002.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2009.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard— 9. ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CORTES, S.M.S. O Tratamento de Ferida: Um Artigo de Revisão. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 2, n.1, p. 55-64, Jan.-Jun., 2013.

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

DAESCHLEIN, G. et al. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. **Journal of the german society of dermatology**, v. 13, n. 2, p. 143-149, 2015.

DANCKWARDT, S; HENTZE, M. W; KULOZIK, A. E. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, p. 1257–1271, 2013.

DANTAS, N. et al., Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-Biological Interactions**, v. 280, p. 8–14, 2018.

DECLOUR, A. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **National Institutes of Health**, v. 1749, n. 5, p. 808-816, 2009.

DUARTE, A. V. S; ALVES, M. A. Úlcera de pressão: fatores de risco em pacientes hospitalizados. **Revista Diálogos Acadêmicos**, v. 2, n. 2, p. 102-108, 2013.

DUCHOWICZ, P. R. et al. Application of descriptors based on Lipinski's rules in the QSPR study of aqueous solubilities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3711-3719, 2007.

EPIFANIO, W. A. N. **Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

EVANS, N. D. et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 28, p. 397-409, 2013.

FERREIRA, V. M. et al. Infecções comunitárias do trato urinário em Divinópolis, MG: avaliação do perfil de resistência bacteriana e do manejo clínico. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 12, n. 39, p. 1-13, 2017.

FOYE, W. O. et al. Synthesis and biological activity of aminoguanidine hydrazones of 2-pyridine and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, p. 527-530, 1990.

FRANÇA, P. H. B. et al. Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylylhydrazone derivatives, **Acta Pharm.** v. 66, p. 129–137, 2016.

FRANÇA, P. H. B. **Planejamento e síntese de novos derivados aminoguanidínicos visando à atividade leishmanicida**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

FRANCO, J. M. P. L. et al. O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Revista Científica Semana Acadêmica**, v.1, n.72, p.1-17, 2015.

FUZETA, F. P. C. **Relação entre a utilização de antibióticos nos animais de companhia e o surgimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos utilizados em medicina humana**. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias da Saúde). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, Portugal. 2017.

GLAß, M. et al. Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. **Pattern Recognition**, v. 45, n. 9, p. 3154–3165, 2012.

GOETSCH, K. P.; NIESLER, C. U. Optimization of the scratch assay for in vitro skeletal muscle wound healing analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 411, n.1, p. 158–160, 2011.

GONZALEZ, A. C. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

GOSAIN, A; DIPIETRO, L.A. Anging and wound healing. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 321-326, 2004.

GOSSNITZER, E.; FEILER, G.; WAGNER, U.; Synthesis structure investigations, and antimicrobial activity of selected S-trans-6-aryl-4-isopropyl-2-[(E)-1-phenylalkylidene]-(E) – hydrazine]- 1,4-dihydropyrimidine hydrochlorides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.15, n. 1, p.49-61, 2002.

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 572–575, 2016.

GUDIÑA, E. J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

GÜRBYAY, A et al. Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. **Toxicology**. v. 229, n. 1-2, p. 54–61, 2007.

GWENAËL, R. et al. *In vitro* study of the impact of mechanical tension on the dermal fibroblast phenotype in the context of skin wound healing. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 14, p. 3555-3561, 2014.

HAMMES, H. P. et al. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. **PNAS**. v. 88, n. 24, p. 11555-11558, 1991.

HAQUE, S. et al. Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 293-302, 2018.

HINCAL, F; GÜRBAY, A; FAVIER, A. Biphasic Response of Ciprofloxacin in Human Fibroblast Cell Cultures. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine**. v. 1, n. 4, p. 481-492, 2003.

HOLETZ, F.B et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, Outubro, 2002.

HOOPER, D. C; WOLFSON, J. S. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **New England Journal of Medicine**. v. 324, n. 6, p. 384-94, 1991.

HUANG, Y. W. et al. Impacts of penicillin binding protein 2 inactivation on β -Lactamase expression and muropeptide profile in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Molecular Biology and Physiology**, v. 2, n. 4, p. 1-14, 2017.

HUSSEIN, A. J. et al. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. **North American journal of medical sciences**, v. 3, n. 4, p. 193-197, 2011.

JIANG, X. et al. Dracorhodin perchlorate regulates fibroblast proliferation to promote rat's wound healing. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 136, n. 2, p. 66-72, 2018.

KARATAN, E; WATNIK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.

KARDOS, N; DEMAIN, A. L. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 677-87, 2011.

KASSAM, N. A. et al. Spectrum and antibiogram of bacteria isolated from patients presenting with infected wounds in a Tertiary Hospital, northern Tanzania. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 757, p. 1-6, 2017.

KAYE, K. S. et al. Effect of Nosocomial Bloodstream Infections on Mortality, Length of Stay, and Hospital Costs in Older Adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 62, n. 2, p. 306–311, 2014.

KAYE, K. S. et al. Rising United States Hospital Admissions for Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections: Recent Trends and Economic Impact. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1-13, 2015.

KIMA, Y; FARRAH, S; BANEY, R. H. Structure–antimicrobial activity relationship for silanols, a new class of disinfectants, compared with alcohols and phenols. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 29, n. 2, p. 217-222, 2007.

KRAMER, N. et al. *In vitro* cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013.

KUMARI, S. S. et al. Aquaporin 5 promotes corneal wound healing. **Experimental Eye Research**, v. 172, p. 152-158, 2018.

LACHIEWICZ, A. M. et al. Bacterial Infections After Burn Injuries: Impact of Multidrug Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 12, p. 2130–2136, 2017.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471-1485, 2005.

LANGE, U. E. W et al. D-Phe-Pro-Arg type thrombin inhibitors: unexpected selectivity by modification of the P1 moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 13, n. 12, p. 2029-2033, 2003.

LARSEN, S. D. Et al. Synthesis and biological activity of analogues of the antidiabetic/antiobesity agent 3-guanidinopropionic acid: discovery of a novel aminoguanidino acetic acid antidiabetic agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1217–1230, 2001.

LAUREANO, A; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 69, n. 3, p. 355-367, 2011.

LAWALL, H. Treatment of chronic wounds. **Vasa**, v. 41, n. 6, p.396-409, 2012.

LEAL, E. C; CARVALHO, E. Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 9, n. 3, p. 133-143, 2014.

LÉOTOING, L. et al. French hospital discharge database (PMSI) and bacterial resistance: Is coding adapted to hospital epidemiology? **Médecine et Maladies Infectieuses**, p. 1-9, 2018.

LI, J; CHEN, J; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.

LIA, E. N. O desafio do emprego antibióticos na Odontologia: qual é a “medida certa”? **Oral Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 2014.

LIANG, C. C; PARK, A. Y; GUAN J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIPINSKI, A. C. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.46, p. 3-26, 2001.

MAI-PROCHNOW, A et al. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. **Scientific Reports**. v. 6, n. 38610, p. 1-11, 2016.

MALAQUIAS, S. G. et al. Integridade tissular prejudicada, fatores relacionados e características definidoras em pessoas com úlceras vasculares. **Texto & Contexto Enfermagem**, v 23, n. 2, p. 434-442, 2014.

MANDELBAUM, S.H; DI SANTIS, É.P; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Journal Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul./ago. 2003.

MARQUIS, R. E; SARAH A. CLOCK, S. A; MOTA-MEIRA, M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, n. 5, p. 493–510, 2003.

MARTIN, P; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, p. 370–378, 2015.

MARTINS, T. L. C. et al. Synthesis of Guanylhydrazones Under Microwave Irradiation. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 21, p. 3891–3899, 2004.

MASSIE, J. B et al. Postoperative Posterior Spinal Wound Infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 284, p. 99-108, 1992.

MATTA, R. et al. Epidemiology and microbiological profile comparison between community and hospital acquired infections: A multicenter retrospective study in Lebanon. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 3, p. 405-411, 2018.

MEDEIROS B. G. S. et al., Análise molecular da atividade antimicrobiana da lisozima. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 13, n. 2, p. 50- 55, 2017.

MEIRELES, I.B; SILVA, R.C.L. Fundamentos biológicos para o atendimento o portador de lesões de pele. Termo In: SILVA, R. C. L. et al., (Org). **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. 3. ed. rev. Ampl. São Caetano do Sul, SP: Yendis Editora, 2011.

MESSEDER, J. C. et al. Aromatic Guanyl Hydrazones: Synthesis, Structural Studies and in vitro Activity against Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 5, n. 24, p. 3079–3084, 1995.

MICROBIOLOGY INFOR. Acesso em 19 de março de 2019. Disponível em: <https://microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>

MUNITA, J. M; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

NOGUEIRA, H. S. et al., Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. **Revista Unimontes Científica**, v. 18, n. 2, p.96-108, 2016.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. 6 ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, C. S. et al. Synthesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-staphylococcal Activity of N-Acylhydrazones and New 1,3,4-Oxadiazole Derivative. **Molecules**. v.17 , n. 5, p. 5095-5107, 2012.

OPWIS, K. et al. Semi-industrial production of methane from textile wastewaters. **Energ Sustain Soc**. v. 2, n. 1, p. 1-6, 2012.

ORNER, B. P.; HAMILTON, A. D. The Guanidinium Group in Molecular Recognition: Design and Synthetic Approaches. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**. v. 41, p. 141–147, 2001.

PAGGIARO, A.O; NETO, N.T; FERREIRA, M.C. Princípios gerais do tratamento de feridas. **Revista Medicina**. v. 89, n. 3/4, p. 132-6, 2010.

PEREIRA, A. L; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955) da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

PESSANHA, F.S; OLIVEIRA, B.G.R.B. Perfil sociodemográfico e clínico de pacientes ambulatoriais com úlceras da perna. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, Recife, v. 9, n. 7, p. 8551-60, jul., 2015.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n. 2, p.382-402, 2006.

PINHATTI, V. R. et al. Cytotoxic, mutagenicity, and genotoxicity effects of guanyldrazone derivatives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 806, p. 1-10, 2016.

PIRES, C. A. et al . Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 45-50, 2015.

PLANZ, V; WANGA, J; WINDBERGS, M. Establishment of a cell-based wound healing assay for bio-relevant testing of wound therapeutics. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 89, p. 19-25, 2018.

PORTO, C. C. **Semiologia Médica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

PUTAROV, N. B; GALENDE, S. B. Estudo da relação estrutura química e atividade farmacológica dos antibióticos. **Revista Uningá**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2011.

RATTANAUMPAWAN, P; THAMLIKITKUL, V. Epidemiology and economic impact of health care-associated infections and cost-effectiveness of infection control measures at a Thai university hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 2, p. 145-150, 2017.

RIBEIRO, M; CORTINA, M. A. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS). **Revista Científica UMC Mogi das Cruzes**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2016.

ROBERTS, R. R. et al., Hospital and Societal Costs of Antimicrobial-Resistant Infections in a Chicago Teaching Hospital: Implications for Antibiotic Stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1175–1184, 2009.

ROBINS-BROWNE, R.M. et al. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n.141, p. 1- 9, 2016.

SANTOS, V et al. Wound Healing: Stagnant/Chronic Wounds Particularity. **Journal of Aging & Inovation**, v. 1, n. 2, p. 32-39, 2012.

SANTOS, W. B. et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Revista SOBECC**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 2016.

SANTOS-FILHO, O. A; FIGUEROA-VILLAR, J. D; ARAUJO, M. T. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 13, p. 1797-1802, 1997.

SANTOS, A. V. et al. Perfil das infecções hospitalares nas unidades de terapia intensiva de um hospital de urgência. **Revista enfermagem UFPE on line**. v.10, n. 1, p. 194-201, 2016.

SARMENTO, P.A. et al. **Formulação farmacêutica contendo como princípio os derivados da Aminoguanidina ou guanilhidrazoniços com atividade antidiabética e/ou inibidora dos produtos finais da glicação avançada**. BR n. PI 102016000145-5 A2, 11 nov 2017.

SCHMIDTCHEN, F. P; BERGER, M. Artificial organic host molecules for anions, **Chemical Reviews**. v. 97, n. 5, p. 1609-1646, 1997.

SCHUMOCK, G. T. et al. National trends in prescription drug expenditures and projections for 2015. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 72, n. 9, p. 717-736, 2015.

SCHWARTZ, C. M. et al. The wound healing capacity of undifferentiated and differentiated airway epithelial cells in vitro. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 112, p. 163-168, 2018.

SENNE, M. I. et al. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. **RSBO. Revista Sul-Brasileira de Odontologia**. v. 6, n. 1, p. 71-76, 2009.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial Resistance: An Antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819-829, 2018.

SHRESTHA, K. S. et al. Bis(N-amidinohydrazones) and N-(amidino)-N'-aryl-bishydrazones: New classes of antibacterial/antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 25, n. 1, p. 58-66, 2017

STUNOVA, A; VISTEJNOVA, L. Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 39, p. 137-150, 2018.

TAGLIABUE, A; RAPPUOLI, R. Changing Priorities in vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. **Front Immunol**, v. 9, n. 1068, p. 1-9, 2018.

TAZIMA, M.F.G.S; VICENTE, Y.A.M.V.A; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008.

TIAN, M et al. Aminoguanidine cream ameliorates skin tissue microenvironment in diabetic rats. **Archeves of Medical Science**. v. 12, n. 1, p. 179–187, 2016.

VEDULA, S.R. K. et al. Collective cell migration: a mechanistic perspective. **Physiology**, v. 28, n. 6, p. 370-379, 2013.

VELEMA, A. W et al. Ciprofloxacin–Photoswitch Conjugates: A Facile Strategy for Photopharmacology. **Bioconjugate Chemistry**. v. 26, n. 12, p. 2592–2597, 2015.

VELNAR, T; BAILEY, T; SMRKOL, J.J. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**. v.37, n.1, p.1528 – 1542, 2009.

VERÍSSIMO, R. C. S. S. et al. **Composição farmacêutica para tratamento de feridas infectadas contendo derivados de Aminoguanidina**. Brasil patente BR n. PI 102015003317-6 A2, 23 maio 2017.

VERMELHO, A. B; BASTOS, M. C. F; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia Geral**. 1º ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2007.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde, São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WEI, Z. Y. et al. Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives containing aminoguanidine or acylhydrazone moieties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 24, p. 5920-5925, 2016.

WILGUS, T. A; ROY, S; MCDANIEL, J. C. Neutrófilos e reparo de feridas: ações positivas e reações negativas. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 379 – 388, 2013.

WILLIAMSON, D; HARDING, K. Wound healing. **Medicine**, v. 32, n. 12 , p 4-7, Dezembro, 2004.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, p. 4055–4061, 2011.

ZHANG, C. L et al. Thermodynamic and kinetic parameters of ciprofloxacin adsorption onto modified coal fly ash from aqueous solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 163, n. 1, p. 53-56, 2011.